

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Biologie – Santé ED 524

FACULTE DE MEDECINE

Institut Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques (GEIST)

UMR 1092

Thèse

Thèse N° [-2013]

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Lucie MORERE

Le 19/07/2013

Modèles d'étude de nouvelles molécules anti-CMV dans le placenta

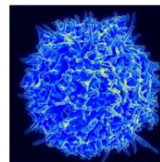
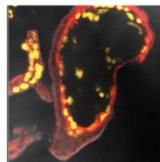
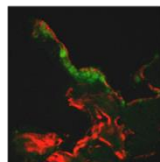
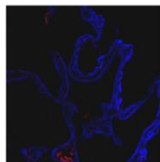
Directeur de thèse : Pr. Sophie ALAIN

JURY :

Président : Mr François DENIS, Professeur, Université de Limoges

Rapporteurs: Mme Florence MORFIN-SHERPA, Professeur, Université de Lyon
Mme Marie-Christine MAZERON, Docteur, Université de Paris VII

Examineurs: Mme Natacha TEISSIER, Docteur, Université de Paris V
Mme Sophie ALAIN, Professeur, Université de Limoges



A mon mari Almine Abdoulaye Seybou,

Et à ma canaille Marwane

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury pour le temps précieux que vous accordez à ce travail, Mr François Denis de m'avoir fait l'honneur de présider le jury, Madame Florence Morfin et Madame Marie-Christine Mazeron d'avoir acceptées d'être rapporteur, Madame Natacha Teissier et Madame Sophie Alain d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Je remercie Madame Marie-Cécile Ploy pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire UMR1092. Je souhaite vous remercier pour votre démarche dans l'obtention de moyens financiers et matériels qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie plus particulièrement Sophie Alain pour votre accueil au sein de l'équipe « viro », votre grande gentillesse et pour la confiance que vous m'avez accordé tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier Sébastien et Sandra pour votre temps consacré à la relecture de ce travail, votre esprit critique, votre gentillesse et votre soutien moral.

Je tiens à remercier toutes les techniciennes d'anapath du CHU de Limoges, Angélique et Sylvie pour votre aide dans les techniques d'immunohistochimie et dans l'observation des lames.

Je tiens à remercier Claire pour ton aide précieuse au confocal, ta disponibilité et ta grande gentillesse.

Je tiens à remercier Yoanne pour tes idées lumineuses dans la recherche fondamentale. Merci pour nos pauses café qui m'ont permis de mieux appréhender mon sujet. Nos échanges ont été une véritable source d'inspiration pour mon travail de thèse.

Je tiens également à remercier Sylvie pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton humilité et ta grande disponibilité pour le travail « souris ». J'ai passé d'excellents moments et de fous rires en ta compagnie. Je remercie également Bernadette, sans qui les souris ne seraient pas à leur aise !!!

Je tiens à remercier Hussein, Thomas et Elodie pour nos bons moments passés ensemble, votre soutien et surtout merci Hussein pour le n°633 !!!

Je remercie toute la « team clinique de viro ». Grand merci à Léandre, Delphine et Mickaël pour votre sourire et votre bonne humeur en toutes circonstances. Vous avez toujours été disponibles, et je vous en remercie. Je remercie également Véronique, Amandine, Joëlle, Valérie et Béatrice pour votre aide.

Je remercie toute la « team viro ». Je tiens à remercier Fadi pour nos débats fluctueux, ton apport technique et ta bonne humeur. Je remercie SebCot pour ton aide précieuse sur les techniques de culture cellulaire et d'essais antiviraux et Raph pour ton esprit critique. Je vous remercie tous les deux pour ses supers bons moments passés ensemble, votre gentillesse, votre soutien indéfectible et merci pour notre complicité. Je remercie également Déborah, le nouveau papa Tonio et Rémy pour les bons moments et pour votre aide.

Je remercie toute la « team bactério ». Je remercie plus particulièrement ma poulette Emilie pour nos FORMIDABLES moments passés ensemble à refaire le monde, ton soutien moral, ta générosité, ton amitié. Tu m'as donné la pêche dans ma quête du Prix Nobel !!! Je tiens à remercier Martine, ma deuxième maman. Merci de m'avoir soutenu, pris soin de moi et merci pour l'importance que tu accordes à mon fils et à mon mari. Je remercie les plus anciens, Thibault, Aurore, Emilie et Olivier pour votre soutien et pour les pauses café passées ensemble. Je remercie également les derniers arrivants, Benjamin, alias Dexter, Margaux, Elodie et Murielle. Merci pour votre gentillesse et votre soutien.

Je tiens à exprimer des remerciements à mes parents, à Georgeo et Mariote pour votre soutien moral. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir poussé tout au long de mon cursus universitaire et d'avoir cru en moi. Merci Papa pour nos échanges dans ce travail de thèse. Merci Mère Mother pour ton aide précieuse et ton amour pour Wanou.

Je dédie ma thèse à mon fils Marwane et mon mari Almine. Marwane, ta venue au monde m'a fait découvrir le bonheur d'être mère, de nouvelles responsabilités et surtout m'a permis de développer une grande confiance. Tu m'apportes que du bonheur avec tes rires, ta bonne humeur, tes câlins et surtout tes canailleries !!! Almine, je te remercie pour tout ton amour, ta gentillesse, ton humilité, ta générosité, ta bonne humeur. Merci de m'avoir encouragé, soutenu et toujours cru en moi. Je vous remercie tous les deux, au plus haut point, pour votre amour. Que l'avenir nous réserve de belles aventures !!!

Liste des abréviations

- ❖ ACV : Aciclovir
- ❖ BAC : Chromosome Artificiel Bactérien
- ❖ BSA : Bovine Serum Albumin
- ❖ CDV : Cidofovir
- ❖ Cdk : kinase Cycline-dépendante
- ❖ CHPMPC : Cidofovir cyclique
- ❖ CI₅₀ : Concentration inhibant 50 % l'infection
- ❖ CI₉₀ : Concentration inhibant 90 % l'infection
- ❖ CK7 : CytoKératinocyte 7
- ❖ CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- ❖ CMP : Phosphodiesterase Cyclique Cellulaire
- ❖ CMVH : Cytomégalovirus humain
- ❖ CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
- ❖ CPV : Cyclopropavir
- ❖ CTEV : CytoTrophoblastes ExtraVilleux invasifs
- ❖ CTV : CytoTrophoblastes Villeux
- ❖ DAB : 3,3'-DiAminoBenzidine
- ❖ DHODH : DiHydroOrotate DeHydrogenase
- ❖ DMSO : DiMethyl SulfOxide
- ❖ E.A : Early Antigen
- ❖ EGF : Epithelial Growth Factor
- ❖ EGF-R : Epithelial Growth Factor Receptor
- ❖ ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays
- ❖ FCS : Fetal Calf Serum
- ❖ GCV : Ganciclovir
- ❖ GFP : Green Fluorescent Protein
- ❖ gB : glycoprotéine B
- ❖ gP : glycoprotéines
- ❖ GPCMV : Cytomégalovirus de cochon d'Inde
- ❖ HCG : Human Chorionic Gonadotropin
- ❖ HEL : Human Embryonic Lung fibroblasts

- ❖ HET : Human Embryonic Tonsil, Fibroblasts
- ❖ HFF : Human Foreskin Fibroblasts
- ❖ HHV : Herpès Virus Humain
- ❖ HHV6 : Herpès Virus Humain de type 6
- ❖ HPL : Human Placental Lactogen
- ❖ HPLC : High Performance Liquid Chromatography
- ❖ HSV1 : Herpès Simplex de type 1
- ❖ HSV2 : Herpès Simplex de type 2
- ❖ I : Interphase
- ❖ IDO : Indoleamine 2,3-DiOxygenase
- ❖ I.E.A : Immediate Early Antigen
- ❖ IFN- α , β , γ : Interféron alpha, bêta, gamma
- ❖ IL : InterLeukine
- ❖ IMO : Indirubin-3'-MonOxime
- ❖ i.p : intrapéritonéale
- ❖ IVG : Interruption Volontaire de Grossesse
- ❖ JEV : Virus de l'Encéphalite Japonaise
- ❖ L.A : Late Antigen
- ❖ LB : Lymphocyte B
- ❖ LDH : Lactate DeHydrogenase
- ❖ LT : Lymphocyte T
- ❖ M : Mitose
- ❖ MBV : Maribavir
- ❖ MCMV : Cytomégalovirus murin
- ❖ MOI : Multiplicité d'infection
- ❖ MRC-5 : Human Embryonic Lung Fibroblasts
- ❖ NK : Natural Killer
- ❖ Pac : cis-acting packaging elements
- ❖ PARP : Poly ADP-Ribose Polymérase
- ❖ PCR : Polymerase Chain Reaction
- ❖ PDGF-R : Platelet Derived Growth Factor Receptor
- ❖ PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
- ❖ pfu : plaque forming unit
- ❖ p.i : post-infection

- ❖ PI3K : PhosphoInositide 3 Kinase
- ❖ PKC : Protéine Kinase C
- ❖ PLC : PhosphoLipase C
- ❖ PFA : Foscarnet
- ❖ PGH : Placental Growth Hormone
- ❖ pRb : protéine suppresseur de tumeurs
- ❖ RCMV : Cytomégalovirus de rat
- ❖ RhCMV : Cytomégalovirus de macaque rhésus
- ❖ rpm : rotation par minute
- ❖ SCID : Severe Combined Immuno Deficiency
- ❖ SCL : SarCoLectine
- ❖ SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
- ❖ SNC : Système Nerveux Central
- ❖ SNP : Système Nerveux Périphérique
- ❖ ST : SyncytioTrophoblastes
- ❖ SVF : Sérum de Veau Fœtal
- ❖ TCR : T-Cell Receptor
- ❖ TLR : Toll-Like Receptor
- ❖ TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha
- ❖ VAC : valaciclovir
- ❖ VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine
- ❖ VZV : Virus Varicelle Zona

Table des matières

<u>Introduction</u>	1
---------------------------	---

<u>Etude bibliographique</u>	5
------------------------------------	---

A) <u>Cytomégalovirus</u>	7
I) <u>Cytomégalovirus, herpès virus de type 5</u>	7
a. <u>Généralités sur les herpès virus</u>	7
i. <u>Classification des herpes virus</u>	7
b. <u>Structure du cytomégalovirus</u>	9
c. <u>Cycle d'infection du cytomégalovirus</u>	11
i. <u>Fixation du virus et pénétration dans la cellule hôte</u>	11
✚ <u>Fixation du virus à la membrane cellulaire</u>	11
✚ <u>Activation de la cascade de signalisation cellulaire</u>	13
ii. <u>Réplication virale</u>	13
iii. <u>Encapsidation</u>	15
iv. <u>Tégumentation et libération des néovirus</u>	17
II) <u>Physiopathologie de l'infection à CMVH</u>	17
a. <u>Modes de transmission du cytomégalovirus</u>	17
b. <u>Tropisme cellulaire du cytomégalovirus</u>	19
c. <u>Latence et réactivation</u>	21
d. <u>Système immunitaire et CMV</u>	23
i. <u>Immunité innée</u>	23
ii. <u>Immunité adaptative</u>	25
✚ <u>Réponse humorale</u>	25
✚ <u>Réponse médiée par les lymphocytes T</u>	25
• <u>Rôle des CD4⁺</u> ;.....	25
• <u>Rôle des CD8⁺</u>	27

• <u>Rôle des $\gamma\delta$</u>	27
iii. <u>Echappement du CMV au système immunitaire</u>	29
e. <u>Manifestations cliniques et épidémiologie</u>	31
i. <u>Infection chez le patient immunocompétent</u>	31
ii. <u>Infection chez le patient immunodéprimé</u>	31
✚ <u>Séropositifs VIH</u>	31
✚ <u>Transplantés d'organes</u>	33
✚ <u>Receveurs de cellules souches hématopoïétiques</u>	35
iii. <u>Infection congénitale, pré et post-natale</u>	35
III) <u>Diagnostic de l'infection à CMV</u>	37
a. <u>Techniques de détection de l'infection à CMVH</u>	39
i. <u>Culture cellulaire</u>	39
ii. <u>Antigénémie pp65 (détection des antigènes viraux dans le sang)</u>	41
iii. <u>Antigènes viraux dans les autres prélèvements</u>	41
iv. <u>Acides nucléiques viraux</u>	41
v. <u>Sérologie CMV</u>	41
b. <u>Méthodes diagnostiques de l'infection en fonction du patient</u>	43
i. <u>Infection chez l'immunocompétent</u>	43
ii. <u>Infection maternofoetale</u>	43
✚ <u>Chez la femme enceinte</u>	43
✚ <u>Chez le fœtus</u>	45
✚ <u>Chez le nouveau-né</u>	45
iii. <u>Infection chez l'immunodéprimé</u>	47
✚ <u>Infection chez le patient séropositif pour le VIH</u>	47
✚ <u>Infection chez le transplanté</u>	47
 B) <u>Placenta</u>	 49
I) <u>Généralités</u>	49
II) <u>Placentation</u>	49
a. <u>De la fécondation à la nidation</u>	49
b. <u>Formation du blastocyste</u>	51
c. <u>Différenciation du trophoctoderme</u>	51
d. <u>Différenciation de l'embryoblaste</u>	53

e. <u>Formation des villosités placentaires</u>	53
III) <u>Placenta et micro-organismes</u>	57
C) <u>Infections congénitale et néonatale à CMV : apport des modèles dans la compréhension des mécanismes de l'infection</u>	59
I) <u>Généralités</u>	59
II) <u>Découverte de l'infection congénitale <i>in situ</i></u>	61
III) <u>Infection placentaire dans des modèles <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i></u>	63
IV) <u>Infection congénitale et néonatale dans des modèles <i>in vivo</i></u>	67
a. <u>Cochon d'Inde</u>	67
b. <u>Macaque rhésus</u>	71
D) <u>Thérapeutique anti-cytomégalovirus</u>	75
I) <u>Cycle cellulaire</u>	75
a. <u>Etapes du cycle cellulaire</u>	75
b. <u>Cycle cellulaire et complexe Cdks/Cyclines</u>	75
i. <u>Structure des Cdks</u>	77
ii. <u>Complexes Cdks/Cyclines au cours du cycle cellulaire</u>	77
iii. <u>Cdks régulant la transcription des gènes</u>	81
c. <u>Cytomégalovirus et Cdks</u>	81
II) <u>Antiviraux au cours du cycle cellulaire et viral</u>	85
a. <u>Antiviraux phase très précoce</u>	85
i. <u>Artésunate</u>	85
ii. <u>Sirolimus et évérolimus</u>	85
iii. <u>Fomivirsen</u>	87
iv. <u>Flavonoïdes : Quercétine et Baïcaléine</u>	87
v. <u>Inhibiteurs des Cdks : Roscovitine et Flavopiridol</u>	89
b. <u>Antiviraux phase précoce</u>	89
i. <u>Cible : pUL97 (phase précoce et tardive)</u>	89
✚ <u>Maribavir</u>	91
✚ <u>Indolocarbazoles : Gö6976 et NGIC-I</u>	93
ii. <u>Cible : pUL54, polymérase virale</u>	93
✚ <u>Ganciclovir</u>	93
✚ <u>Cidofovir et ses prodrogues</u>	95

○	<u>Cidofovir</u>	95
○	<u>Cidofovir cyclique</u>	97
○	<u>CMX001 (HDP-CDV) et ODE-CDV</u>	97
○	<u>Cyclopropavir et autres analogues</u> <u>Methylenecyclopropane</u>	97
✚	<u>Foscarnet</u>	99
✚	<u>Aciclovir</u>	101
iii.	<u>Cible : pUL56/pUL89</u>	101
✚	<u>Benzimidazoles ribosides : TCRB et BDCRB</u>	101
✚	<u>BAY 38-4766 (Toméglovir)</u>	103
✚	<u>AIC246 : Létermovir</u>	103
c.	<u>Antiviraux phase tardive</u>	105
✚	<u>Léflunomide</u>	105

***E) Modèles animaux d'infection à CMV utilisés pour le développement d'antiviraux*.....107**

I)	<u>Généralités sur les modèles d'infection à CMV <i>in vivo</i></u>	107
II)	<u>Modèles d'étude d'efficacité des antiviraux</u>	107
a.	<u>Modèles d'infection souris</u>	107
i.	<u>Souris SCID greffées avec des cellules humaines</u>	109
✚	<u>Modèle agarose</u>	109
✚	<u>Modèle « gelfoam »</u>	111
ii.	<u>Souris SCID greffées avec du tissu humain</u>	115
✚	<u>Modèle thymus/foie</u>	115
✚	<u>Modèle rétinite</u>	117
iii.	<u>Modèles d'infection à MCMV</u>	117
b.	<u>Modèles d'infection rat</u>	119
c.	<u>Modèles d'infection cochon d'Inde</u>	123

<u>F) Modèles animaux d'infection à CMV utilisés pour le développement de vaccins</u>	127
<u>I) Vaccins CMV</u>	127
<u>a. Vaccins vivants atténués</u>	129
<u>b. Vaccins inertes entiers et sous-unitaires</u>	129
<u>II) Développement de vaccins chez le cochon d'Inde et le macaque rhésus</u>	131
<u>III) Développement chez l'homme</u>	131

<u>Objectifs</u>	137
-------------------------------	-----

<u>Approche in vitro</u>	141
---------------------------------------	-----

<u>Introduction</u>	143
----------------------------------	-----

<u>Matériels et méthodes</u>	147
---	-----

<u>I) Culture de fibroblastes embryonnaires humains</u>	147
<u>II) Culture virale</u>	147
<u>III) Molécules anti-Cdks</u>	149
<u>IV) Toxicité cellulaire des composants chimiques</u>	149
<u>V) Essais antiviraux</u>	151

<u>Résultats</u>	153
-------------------------------	-----

<u>I) Toxicité cellulaire des drogues</u>	154
<u>II) Efficacité antivirale des anti-Cdks</u>	155
<u>a. Roscovitine</u>	155
<u>b. AZD-5438</u>	155
<u>c. Flavopiridol</u>	155
<u>d. PHA-767 491</u>	161

III) <u>Efficacité antivirale des bithérapies Maribavir/anti-Cdks</u>	161
a. <u>Maribavir/Roscovitine</u>	161
b. <u>Maribavir/AZD-5438</u>	163
c. <u>Maribavir/Flavopiridol</u>	163
<u>Conclusion</u>	165
<u>Publication</u>	169
<u>Partie introductive</u>	170
<u>Introduction</u>	175
<u>Materials and methods</u>	179
I) <u>Cell and viral culture</u>	179
II) <u>Antiviral compounds</u>	179
III) <u>Antiviral assays in cell culture (<i>in vitro</i>)</u>	181
IV) <u>Cytotoxicity assays in cell culture</u>	181
V) <u>Ex vivo model</u>	183
VI) <u>Viral load measurement</u>	183
a. <u>HCMV DNA extraction from explants</u>	183
b. <u>qPCR Albumin/CMV</u>	183
VII) <u>β-HCG dosage</u>	185
VIII) <u>Immunohistochemical assays</u>	185
<u>Results</u>	187
I) <u>Validation of viability of 1st trimester villi explants</u>	187
II) <u>Ex vivo CMV infection kinetics in 1st trimester villi explants</u>	189
a. <u>Viral load kinetics</u>	189
b. <u>Immunohistochemistry</u>	193
III) <u>Efficacy and toxicity of anti-CMV molecules <i>in vitro</i></u>	193

a. <u>Association of the two DNA polymerase inhibitors targeting different polymerase domains : GCV/PFA</u>	195
b. <u>Association of MBV with other CMV inhibitors</u>	195
i. <u>Association between the DNA polymerase inhibitor PFA and the late inhibitor MBV</u>	195
ii. <u>Association between MBV and flavonoids</u>	195
iii. <u>Association between MBV and ART</u>	199
c. <u>Association between BAI and other molecules</u>	199
i. <u>Association between BAI and PFA</u>	199
ii. <u>Association between BAI and ART</u>	199
IV) <u>Efficacy of drugs alone or combination ex vivo</u>	199
a. <u>Efficacy of molecules administered alone</u>	199
b. <u>Efficacy of molecules in combination</u>	201
<u>Discussion</u>	205
<u>Conclusion</u>	213
<u>Approche ex vivo</u>	215
<u>Introduction</u>	217
<u>Résultats</u>	221
I) <u>Comparaison de la viabilité des explants avec ou sans éponge</u>	221
II) <u>Comparaison de la cinétique d'infection à CMVH avec ou sans éponge</u>	223
a. <u>Infection avec la souche de référence AD169</u>	223
b. <u>Infection avec la souche clinique P*</u>	225
<u>Conclusion</u>	227

<u>Approche in vivo</u>	229
<u>Introduction</u>	231
<u>Matériels et méthodes</u>	235
I) <u>Grefe des villosités flottantes placentaires chez la souris SCID</u>	235
a. <u>Souris</u>	235
b. <u>Grefe des souris en sous-cutané ou sous-musculaire</u>	235
II) <u>Infection des villosités flottantes</u>	237
a. <u>1^{ère} technique : par injection</u>	237
b. <u>2^{ème} technique : par trempage</u>	237
III) <u>Récupération des greffons</u>	237
IV) <u>Traitement des souris SCID</u>	239
V) <u>Immunohistochimie sur coupes en paraffine</u>	239
VI) <u>Test de vascularisation des greffons</u>	241
a. <u>Validation de la vascularisation des greffons après greffe sous-cutanée</u>	241
b. <u>Validation de la vascularisation des greffons après greffe musculaire</u>	243
i. <u>Détermination de la concentration de norleucine à administrer et temps nécessaire à cette molécule pour parcourir la circulation sanguine</u>	243
ii. <u>Détection de la norleucine par HPLC</u>	245
<u>Résultats</u>	247
I) <u>Modèle sous-cutané</u>	247
a. <u>Principe du modèle</u>	247
b. <u>Anatomie des compartiments cellulaires des villosités flottantes et infection par le CMVH</u>	247
c. <u>Prolifération cellulaire dans greffons</u>	249
d. <u>Cinétique de l'infection</u>	251
e. <u>Cinétique de l'infection par trempage et traitement au cidofovir</u>	251
i. <u>Principe du modèle et cinétique de l'infection</u>	251
ii. <u>Efficacité antivirale du cidofovir</u>	253

II) <u>Modèle sous-musculaire</u>	255
a. <u>Principe du modèle</u>	255
b. <u>Validation de la vascularisation</u>	257
<u>Conclusion</u>	263
<u>Discussion générale</u>	265
<u>Conclusion</u>	283
<u>Références bibliographiques</u>	287

Liste des Figures

✚	Figure 1 : Etapes de la réplication virale du CMVH.....	8
✚	Figure 2 : Représentations en 3 dimensions du CMVH.....	8
✚	Figure 3 : Cycle d'infection du CMVH dans la cellule hôte.....	10
✚	Figure 4 : Voie de signalisation cellulaire NFκB.....	12
✚	Figure 5 : Physiopathologie de l'infection à CMVH.....	20
✚	Figure 6 : Réponses immunitaires innée et acquise.....	22
✚	Figure 7 : CMVH et systèmes immunitaires inné et adaptatif.....	24
✚	Figure 8 : Manifestations cliniques chez le fœtus et le nouveau-né.....	36
✚	Figure 9 : Epidémiologie de l'infection congénitale.....	36
✚	Figure 10 : Effet cytopathique du CMVH.....	40
✚	Figure 11 : Diagnostic de l'infection à CMVH au cours de la grossesse.....	42
✚	Figure 12 : Surveillance des marqueurs de l'infection à CMVH au cours de l'infection VIH.....	46
✚	Figure 13 : Surveillance de l'infection à CMV après greffe.....	46
✚	Figure 14 : Etapes de la fécondation à la nidation via les trompes utérines.....	48
✚	Figure 15 : Interface cellules fœtales/maternelles : Villosité crampon, lieu de migration des cytotrophoblastes extravilloux dans la décidua.....	50
✚	Figure 16 : Disparition des cytotrophoblastes au cours du 4 ^{ème} mois de grossesse...50	
✚	Figure 17 : Différenciation de l'embryoblaste.....	52
✚	Figure 18 : Formation de la vésicule vitelline et de la cavité chorale.....	52
✚	Figure 19 : Formation des capillaires fœtaux dans les villosités placentaires.....	54
✚	Figure 20: Placenta, focus sur les villosités flottantes à 6 semaines de gestation ...	55
✚	Figure 21 : Infections congénitales et périnatales.....	56
✚	Figure 22 : Interface placentaire mère/fœtus 10 semaines post-gestation.....	60
✚	Figure 23 : Détection par imagerie du MCMV-GFP administré en sous-cutané à J1, J2 et J3 post-infection chez la souris.....	68
✚	Figure 24 : Macaca mulatta ou macaque rhésus.....	70
✚	Figure 25 : Etapes du cycle cellulaire.....	74
✚	Figure 26 : Complexes Cdk/Cyclines au cours du cycle cellulaire.....	76
✚	Figure 27 : Traitements anti-CMVH ciblant différents stades du cycle de réplication virale et du cycle cellulaire.....	82
✚	Figure 28: Structure chimique de l'artésunate.....	83
✚	Figure 29 : Effet inhibiteur de l'artésunate sur le cycle de réplication du CMVH.....	83
✚	Figure 30 : Structure chimique du Sirolimus (a), de l'Évérolimus (b).....	84
✚	Figure 31 : Structure chimique du Fomivirsén.....	86
✚	Figure 32 : Structure chimique de la Baïcaléïne (a) & de la Quercétine (b).....	86
✚	Figure 33 : Structure chimique de la Roscovitine (a) & du Flavopiridol (b).....	88
✚	Figure 34 : Structure chimique du Maribavir.....	90
✚	Figure 35 : Structure chimique du Gö6976.....	92
✚	Figure 36 : Structure chimique du Ganciclovir.....	92
✚	Figure 37 : Structure chimique du Cidofovir.....	94
✚	Figure 38 : Structure chimique du CMX001.....	96
✚	Figure 39 : Structure chimique de l'ODE-CDV.....	96

+ Figure 40 : Structure chimique du Cyclopropavir.....	96
+ Figure 41 : Structure chimique du Foscarnet.....	98
+ Figure 42 : Structure chimique de l'Aciclovir.....	98
+ Figure 43 : Structure chimique du TCRB (a) & du BDCRB (b).....	100
+ Figure 44 : Structure chimique du BAY 38-4766.....	100
+ Figure 45 : Structure chimique du Létermovir.....	102
+ Figure 46 : Structure chimique du Léflunomide.....	104
+ Figure 47 : Stratégies de développement de vaccins.....	126
+ Figure 48 : Implication des complexes Cdks/Cyclines dans le cycle cellulaire et molécules anti-Cdks.....	144
+ Figure 49 : Efficacité anti-CMVH de la Roscovitine.....	156
+ Figure 50 : Efficacité anti-CMVH de l'AZD-5438.....	157
+ Figure 51: Efficacité anti-CMVH du Flavopiridol.....	158
+ Figure 52: Efficacité anti-CMVH du PHA-767 491.....	159
+ Figure 53 : Efficacité anti-CMVH de l'association MBV/Roscovitine.....	160
+ Figure 54 : Efficacité anti-CMVH de l'association MBV/AZD-5438.....	162
+ Figure 55 : Efficacité anti-CMVH de l'association MBV/Flavopiridol.....	164
+ Figure 56 : Cell viability of placental explants.....	186
+ Figure 57 : Influence of CMV virulence on cell viability.....	186
+ Figure 58 : Kinetics of HCMV infection (AD169 and P* strains) in placental explants.....	188
+ Figure 59 : Tissu sections of placental villi from ex vivo model (Day 10 post-infection).....	190
+ Figure 60 : Tissu sections of placental villi from ex vivo model (Days 16 and 18 post-infection).....	191
+ Figure 61 : Antiviral efficacy of compounds administered alone or in combination in vitro.....	192
+ Figure 62 : Antiviral efficacy of cidofovir against HCMV infection (AD169 and P* strains) in placental explants.....	194
+ Figure 63 : Antiviral efficacy of maribavir, artesunate and baicalein against HCMV infection (AD169 and P* strains) in placental explants, administered alone or in combination.....	197
+ Figure 64 : Modèles d'infection à CMVH ex vivo.....	218
+ Figure 65 : Photographie de villosités flottantes de placenta de 1 ^{er} trimestre de grossesse.....	218
+ Figure 66 : Viabilité cellulaire des explants en présence ou en absence d'éponges.....	220
+ Figure 67 : Cinétique de l'infection AD169 dans les explants en présence d'éponges.....	222
+ Figure 68 : Cinétique de l'infection AD169 dans les explants en absence d'éponges.....	222
+ Figure 69 : Cinétique de l'infection P* dans les explants en présence ou en absence d'éponges.....	224
+ Figure 70 : Modèles d'infection CMVH « sous-cutané » et « sous-musculaire » chez la souris SCID.....	234
+ Figure 71 : Suture de la peau chez la souris SCID.....	236
+ Figure 72 : Photographie d'un greffon de villosités flottantes de placenta, récupéré 21 jours post-greffe chez la souris SCID.....	240
+ Figure 73 : Administration per os de Norleucine chez la souris SCID.....	242

✚ Figure 74 : Tests de validation de la vascularisation des greffons	244
✚ Figure 75 : Marquages des cellules des villosités placentaires par immunohistochimie	246
✚ Figure 76 : Marquages des cellules des villosités placentaires par immunofluorescence	248
✚ Figure 77 : Marquages des noyaux des cellules en prolifération via l'anticorps Ki67 dans les villosités placentaires au cours du temps post-greffe	250
✚ Figure 78 : Cinétique de l'infection à CMVH dans les greffons de villosités flottantes de placenta chez la souris	252
✚ Figure 79 : Efficacité du cidofovir contre l'infection à CMVH dans les greffons de villosités flottantes de placenta chez la souris	254
✚ Figure 80 : Villosités placentaires greffées chez la souris SCID en sous-musculaire	256
✚ Figure 81 : Détection de norleucine à 5 (a) et 10 (b) mM dans le sang des souris 3h30 post-gavage	258
✚ Figure 82 : Détection de norleucine à 20 (a) et 40 (b) mM dans le sang des souris, 3h30 post-gavage	259
✚ Figure 83 : Détection de norleucine à 300 mM dans le sang des souris à 4h (a) et 6h (b) post-gavage	260
✚ Figure 84: Détection de norleucine à 600 mM dans le sang des souris à 4h (a) et 6h (b) post-gavage	261
✚ Figure 85 : Détection de norleucine (300 Mm) dans les greffons de souris, 4h post-gavage, 7 jours post-greffe	262

Liste des Tableaux

+ Tableau 1 : Classification des herpès virus humains	6
+ Tableau 2 : Sites de latence des herpès virus humains	6
+ Tableau 3 : Tropisme cellulaire du cytomegalovirus	18
+ Tableau 4 : Manifestations cliniques chez l'immunocompétent	30
+ Tableau 5 : Manifestations cliniques chez le patient VIH ⁺	32
+ Tableau 6 : Manifestations cliniques chez le transplanté d'organes	32
+ Tableau 7 : Incidence de l'infection à CMVH chez les transplantés d'organes	34
+ Tableau 8 : Manifestations cliniques chez le receveur de cellules souches hématopoïétiques	34
+ Tableau 9 : Infection congénitale et néonatale chez le cochon d'Inde	68
+ Tableau 10 : Ensemble des CI ₅₀ déterminées en culture par essais antiviraux	78
+ Tableau 11 : Effet du traitement GCV, administré en sous-cutané, sur la réplication virale dans les implants de souris inoculées avec du CMVH	110
+ Tableau 12 : Effet du traitement GCV, administré par voie orale, sur la réplication virale dans les greffons de souris inoculées avec du CMVH	112
+ Tableau 13 : Effet du traitement GCV, administré par voie intrapéritonéale, sur la réplication virale dans les greffons de souris inoculées avec du CMVH	112
+ Tableau 14 : Effet des traitements GCV et CPV sur la réplication du CMVH dans les implants de thymus/foie chez la souris SCID	113
+ Tableau 15 : Effet du traitement MBV sur la réplication virale dans les implants de thymus/foie	114
+ Tableau 16 : Effet du traitement MBV sur la réplication virale du CMVH dans les implants de thymus/foie	114
+ Tableau 17 : Effet des traitements GCV et CPV sur la réplication du CMVH dans les implants de tissu rétinien chez la souris SCID	116
+ Tableau 18 : Effet du traitement CDV sur la réplication du CMVH dans les implants de tissu rétinien chez la souris SCID	116
+ Tableau 19 : Effet des traitements GCV et Synguanol sur la mortalité des souris inoculées avec du MCMV	118
+ Tableau 20 : Effet des traitements GCV et Synadenol sur la mortalité des souris inoculées avec du MCMV	118
+ Tableau 21 : Effet du traitement GCV contre l'infection MCMV chez la souris SCID	121
+ Tableau 22 : Effet du traitement BAY 38-4766 contre l'infection MCMV chez la souris SCID	121
+ Tableau 23 : CI ₅₀ et CI ₉₀ du maribavir et des anti-Cdks administrés seuls ou en combinaison	152

✚ <i>Tableau 24 : Pourcentage de mortalité cellulaire après traitements pharmacologiques</i>	154
✚ <i>Tableau 25 : Chemical structure of molecules tested in vitro</i>	178
✚ <i>Tableau 26 : IC₅₀ and IC₉₀ determined in vitro in MRC5 cultures and cellular toxicity</i>	192
✚ <i>Tableau 27 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunohistochimie et immunofluorescence</i>	238

Introduction

Le cytomégalovirus humain (CMVH) appartient à la famille des herpès virus. Ce pathogène opportuniste infecte 50 à 90 % de la population mondiale selon les zones géographiques et les groupes socio-économiques. La transmission du CMV est interhumaine. Elle survient après un contact direct ou indirect par le biais de la salive, du sang, des larmes, des urines, des sécrétions oropharyngées, des sécrétions sexuelles ou du lait maternel (Pass et al. 1982; Pass and Hutto 1986; Nelson and Demmler 1997; Bresson et al. 2003; Kapranos et al. 2003).

Comme tous les herpès virus, le cytomégalovirus persiste de manière latente dans de nombreuses cellules et échappe à la réponse immune. Sa réactivation au sein de l'organisme peut apparaître rapidement à la suite d'un déficit immunitaire et l'absence ou le déficit d'immunité peut conduire à des manifestations viscérales graves. Des réinfections sont également possibles, compte tenu de l'existence de souches virales multiples. La capacité du CMV à se réactiver rend ce virus hautement pathogène chez les immunodéprimés (séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), transplantés). Dans 10 % des cas, il est responsable de symptômes sévères chez ces patients (pneumonie, hépatite...). En revanche, chez les patients immunocompétents, dans 90 % des cas, aucun symptôme n'est décelé.

Le cytomégalovirus est la 1^{ère} cause d'infection virale intra-utérine et périnatale. Dans le monde 1 % des nouveau-nés sont atteints (Kenneson 2007). Le CMVH peut être transmis de la mère au fœtus ou au nouveau-né par différentes voies. On parle d'**infection congénitale** lorsque le fœtus est contaminé *via* le placenta ; d'**infection périnatale** lorsque le fœtus est infecté lors des contractions précédentes l'accouchement *via* des micro-brèches dans le tractus génital ou lors de la délivrance par mélanges du sang maternel et foetal; d'**infection post-natale** lorsque le nouveau-né est infecté *via* l'allaitement. La transmission du virus *via* l'allaitement est le mode d'infection le plus répandu ; 14 % des mères séropositives excrètent du CMV dans le lait (Hamprrecht et al. 2000; Hamprrecht et al. 2001) et 8 à 60 % des nouveau-nés âgés de moins de six mois sont infectés (Reynolds et al. 1973; Stagno et al. 1984). La transmission transplacentaire du virus au fœtus se produit dans 35 à 40 % des cas lors d'une primo-infection et dans 1 à 3 % lors d'une réactivation virale (Stagno et al. 1982). La transmission pourrait dépendre de l'âge gestationnel de la femme enceinte. La transmission semble être plus faible au cours du 1^{er} trimestre de grossesse avec 30 % à 45 % de transmission contre 45 % au cours du 2nd trimestre et 75 % à 80 % au cours du 3^{ème} trimestre (Griffiths and Baboonian 1984; Stagno et al. 1986; Bodeus et al. 1999; Revello and Gerna 2004; Kenneson 2007).

L'infection *in utero* conduit parfois à des séquelles sévères chez les fœtus et les nouveau-nés : 10 à 15 % des nouveau-nés présentent des symptômes à la naissance (hépatomégalie, thrombocytopénie, splénomégalie, pétéchies, purpura...) et parmi les 85 à 90 % des nourrissons nés asymptomatiques, 10 % développent au cours des premières années de leur vie des séquelles neurologiques (microcéphalie, chorioretinite, calcifications intracrâniennes...) (Stagno et al. 1986). La sévérité des séquelles dépend du stade de gestation. 20 à 30 % des nouveau-nés infectés congénitalement au cours du 1^{er} trimestre de grossesse présentent des séquelles du système nerveux central. Si l'infection est transmise plus tardivement, le risque de séquelles diminue.

A l'heure actuelle, quatre molécules anti-CMVH sont disponibles : le valaciclovir (VAC) qui est utilisé dans la prophylaxie de l'infection, le ganciclovir (GCV), le cidofovir (CDV) et le foscarnet (PFA) qui sont utilisés en curatif. Ces molécules ont pour cible la kinase virale pUL97 (GCV) et/ou l'ADN polymérase virale pUL54 (GCV, CDV, PFA, VAC). Ces molécules sont virostatiques mais ne permettent pas d'éradiquer le virus de l'organisme. De plus, ces drogues sont fortement toxiques et ne permettent pas leur administration chez la femme enceinte. Le développement de nouveaux antiviraux est donc une nécessité.

L'étude de la physiopathologie de l'infection virale et de la réponse immune, ou encore l'étude de l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques fait appel à des modèles d'infection. Du fait de la spécificité d'espèce étroite du virus, il n'est pas possible de disposer d'un modèle unique chez la souris ou chez le cochon d'Inde, qui permettrait d'étudier les différents types d'infection à CMV. Si les modèles de CMV murin sont proches de ceux du CMV humain pour l'étude de la réponse immune, celui du cochon d'Inde reflète plus fidèlement l'infection congénitale. En particulier, les cibles des antiviraux diffèrent selon les espèces, il n'est pas possible d'utiliser un CMV animal pour étudier l'ensemble des antiviraux ou en développer de nouveaux ; il faut faire appel à des modèles humanisés avec des tissus humains, pour l'étude des souches de CMV humain. Les modèles sont développés, *ex vivo* (explants) et *in vivo* (implants de tissus sur souris immunodéficientes (SCID)). Ils miment des pathologies associées au CMV, à partir des tissus infectés. Lorsque nous avons commencé notre travail aucun modèle de souris humanisé n'était disponible pour l'étude de l'efficacité et de la toxicité des antiviraux *in vivo*, au cours de l'infection congénitale.

Notre travail de recherche a été de développer deux modèles d'infection placentaire *ex vivo* et *in vivo* pour l'étude de la propagation du virus au sein des villosités flottantes du placenta. Le choix s'est porté sur ces structures placentaires en raison de leur rôle dans la transmission du virus de la mère au fœtus. Ces modèles miment l'infection placentaire *in situ* par deux souches de CMV humain, une souche de laboratoire de référence, AD169, et une souche clinique P* isolée de l'urine d'un nouveau-né infecté. Ces modèles nous ont permis d'étudier l'efficacité de nouvelles molécules susceptibles de réduire l'infection placentaire, après vérification de leur efficacité *in vitro*.

Etude bibliographique

Sous famille des herpesviridae	Herpès virus humains	Taille du génome (Kb)
α-herpesvirinae	Herpès virus type 1 ou Herpès simplex type 1 (HSV1)	152
	Herpès virus type 2 ou Herpès simplex type 2 (HSV2)	155
	Herpès virus type 3 ou Virus-Varicelle-Zona (VZV)	125
β-herpesvirinae	Herpès virus type 5 ou Cytomégalo virus (CMV)	227-236
	Herpès virus type 6 ou Human Herpès Virus 6 (HHV6)	159-162
	Herpès virus type 7 ou Human Herpès Virus 7	144-153
γ-herpesvirinae	Herpès virus type 4 ou Virus Epstein-Barr (EBV)	172-173
	Herpès virus type 8 lié au Kaposi (KSHV)	134-138

Tableau 1 : Classification des herpès virus humains

(Modifié d'après Crough et al. 2009)

HSV	Corps cellulaires des ganglions sensitifs : ganglions de Gasser (HSV1) et ganglions sacrés (HSV2)
VZV	Neurones et cellules gliales satellites des ganglions sensitifs rachidiens et des paires crâniennes
CMV	Cellules CD34 de la moelle, monocytes/macrophages, cellules endothéliales
EBV	Lymphocytes B mémoires
HHV6	Monocytes/macrophages, cellules épithéliales
HHV7	Cellules mononuclées du sang périphérique, cellules épithéliales
HHV8	Lymphocytes B

Tableau 2 : Sites de latence des herpès virus humains

A) Cytomégalovirus

I) Cytomégalovirus, herpès virus de type 5

a. Généralités sur les herpès virus

i. Classification des herpès virus

La famille des herpès virus humains (HHV) ou *Herpesviridae* compte une centaine de virus infectant l'homme et les animaux. Huit sont strictement humains et sont regroupés en trois sous famille : les α -*herpesvirinae*, les β -*herpesvirinae* et les γ -*herpesvirinae* (Tableau 1). Ces virus appartiennent à une même famille en raison de caractéristiques structurales communes et d'une étroite spécificité d'espèces. Ce sont tous des virus à ADN. Ils sont constitués d'une capsidie icosaédrique renfermant l'ADN viral ainsi qu'une enveloppe externe (ou péplos), dérivée de la membrane nucléaire au sein de laquelle sont enchâssées des glycoprotéines de surface nécessaires au contact virus/cellule hôte.

Les herpès virus humains sont largement répandus dans le monde. Leur dissémination est endémique dans de nombreuses régions. Généralement, les infections à HHV sont bénignes. Cependant, elles conduisent parfois à une morbidité voire à une mortalité chez certains patients : les patients âgés, les fœtus ou les patients immunodéprimés (sidéens, patients transplantés).

Suite à une primo-infection à HHV, symptomatique ou non, le virus persiste dans des réservoirs cellulaires. Cet état de latence virale est caractéristique des herpès virus humains. Les infections secondaires, c'est-à-dire les réactivations endogènes et les réinfections exogènes assurent une persistance virale dans l'organisme toute la vie. Les sites de latence des *Herpesviridae* sont multiples et diffèrent par le tropisme cellulaire de chaque virus, c'est-à-dire de sa capacité à infecter un type cellulaire. Les sites de latence des α -*herpesvirinae* sont les ganglions neuro-sensitifs. Les glandes sécrétoires, le système lymphoréticulaire, les cellules épithéliales et fibroblastiques sont les sites d'infection latente des β -*herpesvirinae*. Les γ -*herpesvirinae* sont présents dans les cellules lymphoïdes (Tableau 2).

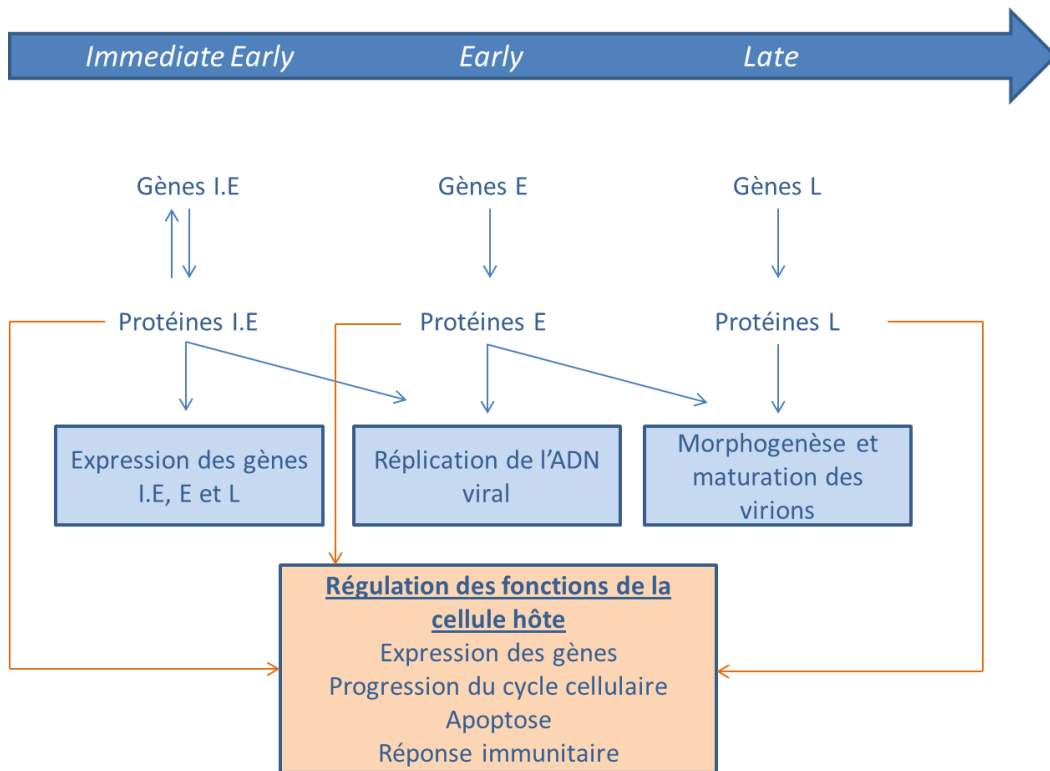


Figure 1 : Etapes de la réplication virale du CMVH

(Modifiée d'après Landolfo et al. 2003)

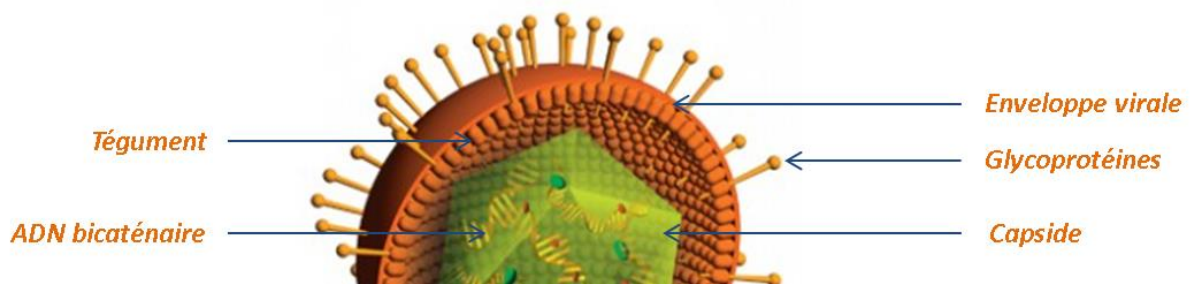


Figure 2 : Représentation en 3 dimensions du CMVH

(Modifiée d'après <http://www.levelofhealth.com/main/cytomegalovirus-seronegative-heart-transplant-recipients-discussion.html>)

Les herpès virus humains se distinguent de la majorité des virus à développement intranucléaire (adénovirus, papovavirus) par leur capacité à faire synthétiser par la cellule hôte, les enzymes responsables de la synthèse de l'ADN viral (thymidine kinase, ADN polymérase) et de l'assemblage des virions (protéases). Les mécanismes de réplication virale sont similaires chez tous les virus de la famille des HHV, mais la durée du cycle lytique et les effets cytopathiques varient selon les virus et les types cellulaires. La réplication virale se déroule en 3 étapes successives : la phase très précoce ou *Immediate Early* (IE), précoce ou *Early* (E) puis tardive ou *Late* (L) (Figure 1). Dès l'arrêt de la réplication, débute la phase lytique, étape aboutissant à la destruction de la cellule hôte. Cette étape est caractérisée par la production de particules virales infectieuses (pleines) ou immatures (vides) qui, pendant leur migration du noyau vers la surface de la cellule acquièrent leurs enveloppes (tégument et enveloppe externe). Des glycoprotéines de surface se fixent également sur l'enveloppe externe au cours de cette migration. Puis les virions sont libérés hors de la cellule hôte par bourgeonnement de la membrane cytoplasmique.

b. Structure du cytomegalovirus

Le cytomegalovirus tient son nom de la cytomégalie qu'il entraîne chez les cellules infectées (Figure 2). Celles-ci sont caractérisées par la présence d'inclusions intranucléaires et intracytoplasmiques, dites en œil de hibou. Le CMV, nommé également herpès virus de type 5 est un virus enveloppé de 200 nm de diamètre en moyenne. Il est constitué d'un ADN bicaténaire, d'une capsidie icosaédrique qui entoure le génome, d'un tégument et d'une enveloppe virale issue de la membrane de la cellule hôte.

- Le **génom**e du cytomegalovirus est le plus grand et le plus complexe des génomes des herpes virus. Il est constitué d'une molécule d'ADN d'environ 250 000 paires de bases.

- La **capsidie virale** ou nucléocapsidie comporte deux protéines principales : pUL86 qui représente 90 % des protéines de la capsidie et pUL85. Ces protéines interviennent dans l'assemblage de la capsidie.

- Le **tégument** ou matrice est situé entre l'enveloppe lipidique et la capsidie. Il contient plusieurs protéines principales : pp65, pp71, pp150, pp28. Ces protéines jouent des rôles importants dans les différents stades du cycle viral : entrée du virus dans la cellule hôte, expression des gènes, assemblage et sortie des néovirions (Shenk and Stinski 2008).

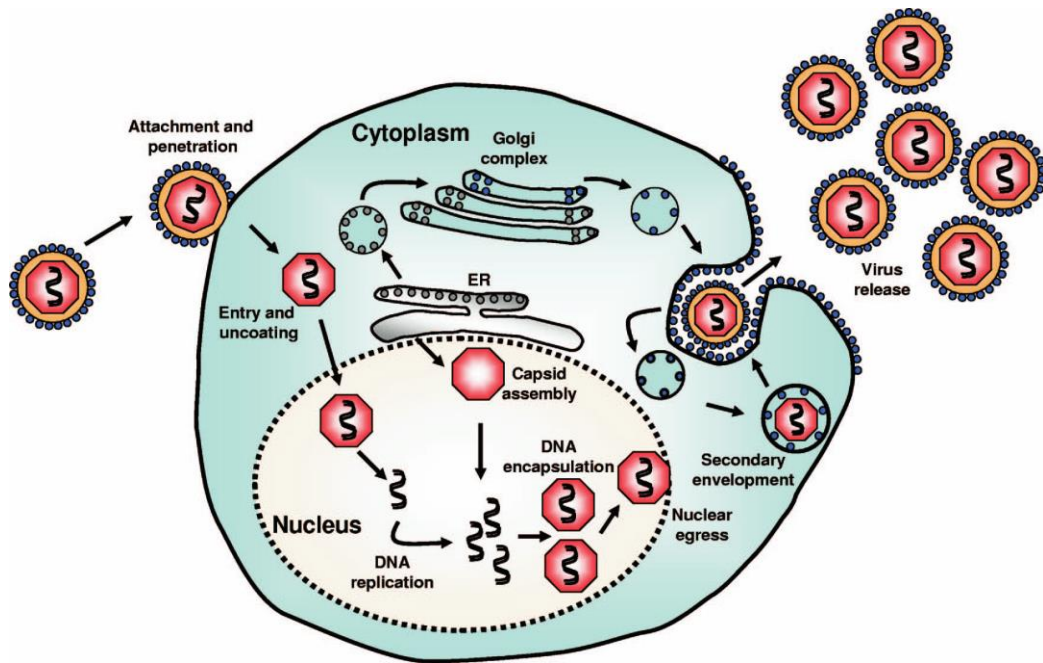


Figure 3 : Cycle d'infection du CMVH dans la cellule hôte

(D'après Crough et al. 2009)

La phosphoprotéine pUL83 ou pp65 est la plus abondante au sein du tégument et du virion (95 % de la masse du tégument). Elle est impliquée dans des mécanismes physiologiques chargés de contrecarrer la réponse immune adaptative et innée (Kalejta 2008). En effet, non seulement pp65 empêche la reconnaissance des protéines *Immediate Early* par les composants du système immunitaire, mais aussi inhibe la synthèse de composants impliqués dans la réponse immune de la cellule hôte infectée (Odeberg et al. 2003). La protéine pp71 joue un rôle important dans l'activation de l'expression des gènes *Immediate Early* (Spaete and Mocarski 1985). Les protéines pp150 et pp28 interviennent dans l'assemblage et la sortie des particules virales hors de la cellule hôte. La protéine pp150, deuxième protéine la plus abondante du tégument, joue un rôle dans l'incorporation des nucléocapsides dans les particules virales (Varnum et al. 2004).

- L'**enveloppe virale** dérive de la membrane nucléaire et de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée. Elle porte à sa surface des glycoprotéines (gp) : gB, gH, gL, gO, gM et gN, codées respectivement par les gènes *UL55*, *UL75*, *UL115*, *UL74*, *UL100* et *UL73*. Ces protéines sont essentielles à l'absorption de la particule virale sur les récepteurs cellulaires, à la fusion des membranes virales et cellulaires, ainsi qu'à l'assemblage et à la libération des néovirions produits par la cellule hôte infectée (Key and Baldwin 1992; Navarro et al. 1993).

c. Cycle d'infection du cytomégalovirus (Figure 3)

i. Fixation du virus et pénétration dans la cellule hôte

✚ Fixation du virus à la membrane cellulaire

La fixation du virus à la cellule hôte fait appel à plusieurs composants cellulaires (récepteurs) et viraux (glycoprotéines).

Le CMV ne possède pas de récepteurs spécifiques. Pour pénétrer dans la cellule, le virus utilise des récepteurs cellulaires, notamment le récepteur à l'Epithelial Growth Factor (EGF-R) et au Platelet Derived Growth Factor (PDGF-R), ainsi que des co-récepteurs, l'annexine II, les protéoglycanes héparine-sulfate ou la β 2-microglobuline (Compton et al. 1993; Wang et al. 2003; Compton 2004; Wang and Shenk 2005; Bentz and Yurochko 2008; Soroceanu et al. 2008).

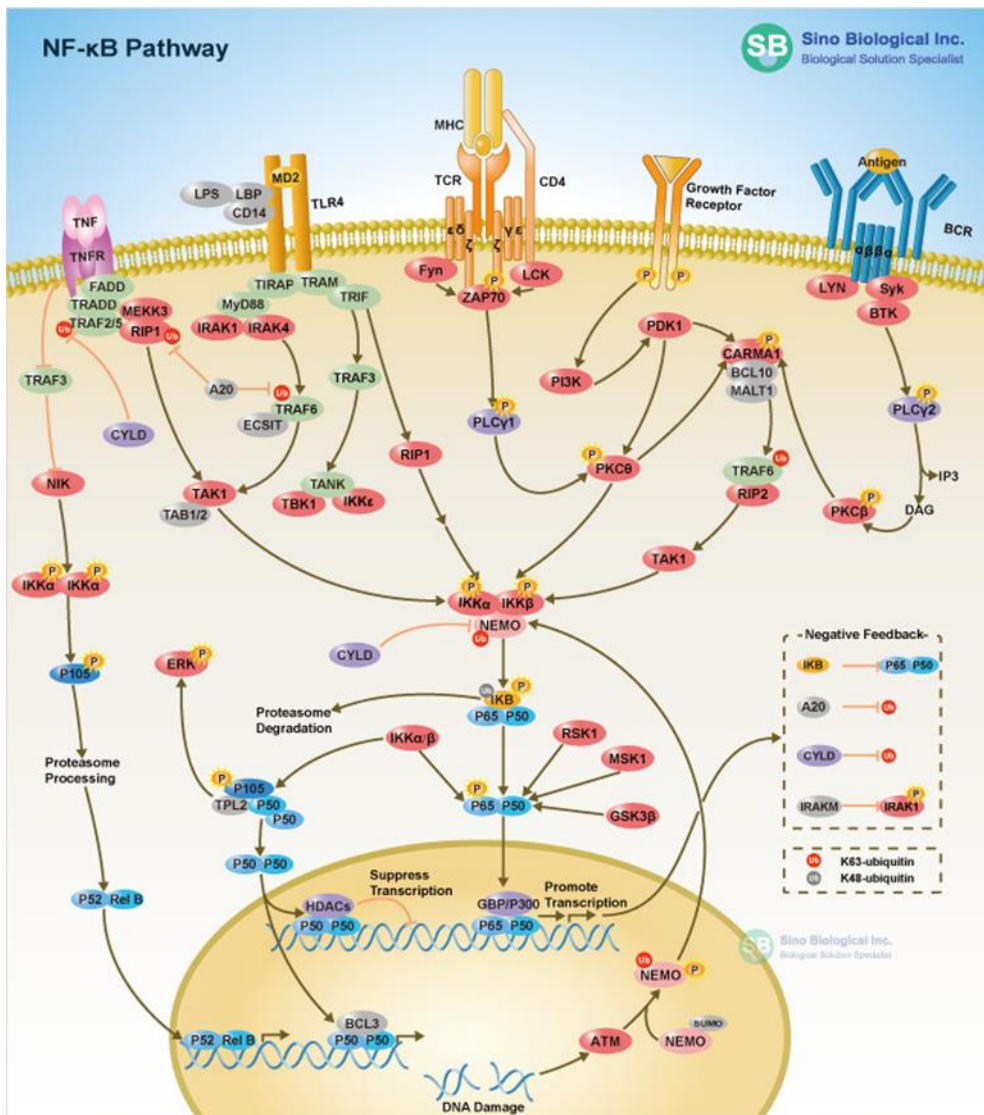


Figure 4 : Voie de signalisation cellulaire NFκB

(D'après Sino biological Inc.)

La liaison du virus aux récepteurs est possible grâce aux glycoprotéines situées sur la membrane virale (gH/gO/gL) (Theiler and Compton 2001). Le virus pénètre ensuite par fusion de son enveloppe avec la membrane cytoplasmique par endocytose. La liaison virus/cellule déclenche une cascade de signalisation cytoplasmique, impliquée dans l'activation de la réplication virale.

Activation de la cascade de signalisation cellulaire (Figure 4)

Dès leur contact avec les cellules cibles, les particules virales induisent des modifications du métabolisme cellulaire qui influent sur la physiologie, en altérant l'expression des gènes cellulaires.

La liaison du virus au récepteur induit l'activation de la phospholipase C (PLC), permettant une libération accrue de calcium intracytoplasmique. La différence d'homéostasie conduit au passage de facteurs de transcription NFκB, Sp1, ERK1 et ERK2 dans le noyau de la cellule hôte (Yurochko et al. 1997; Colimon and Minjolle 2002). Ces facteurs conduisent à la transcription de gènes viraux, permettant le détournement de la machinerie cellulaire. Le CMV en inhibant la synthèse de l'ADN cellulaire, optimise la réplication de son propre ADN (Kovacs et al. 1996; Fortunato and Spector 1998; Lu and Shenk 1999). L'ensemble des perturbations du cycle cellulaire pourrait conduire à des conséquences physiologiques néfastes chez le fœtus.

ii. Réplication virale

La synthèse de l'ADN viral débute 16 heures après l'infection dans le noyau de la cellule hôte. Elle nécessite l'activité de protéines virales et de protéines cellulaires (Mocarsky and Courcelle 2001). Le CMV n'inhibe pas la synthèse de macromolécules cellulaires, mais stimule la transcription et la traduction cellulaire. Celui-ci développe des stratégies pour stimuler les voies biochimiques impliquées dans la biosynthèse des précurseurs de l'ADN. Au cours du cycle cellulaire, il est responsable de l'activation de la translocation nucléaire de Cdk2, induit les cyclines E et B, active l'hyperphosphorylation de la protéine Rb et les proto-oncogènes c-myc, c-jun et c-fos (Jault et al. 1995; Bresnahan et al. 1996; Bresnahan et al. 1997; Salvant et al. 1998).

Malgré l'induction de la phase S du cycle cellulaire dans les cellules infectées, la réplication de l'ADN et la division cellulaire sont empêchées par le virus, qui par compétition stimule l'expression d'enzymes cellulaires conduisant ainsi à la synthèse de précurseurs de l'ADN (Fortunato et al. 2000; Kalejta and Shenk 2002).

La réplication du CMV se déroule, comme pour les autres herpesviridæ, en 3 phases : « très précoce » avec synthèse de protéines activatrices ; « précoce » avec synthèse de protéines enzymatiques dont l'ADN polymérase virale pUL54, protéine indispensable à la réplication virale ; et « tardive » avec synthèse de protéines contribuant à l'assemblage et à la morphologie des virions (composants protéiques de la capsidie et des glycoprotéines d'enveloppe). La réplication de l'ADN viral sépare les phases précoces et tardives.

Elle s'effectue selon un modèle du « cercle roulant ». Après la libération et la translocation dans le noyau, l'ADN viral est circularisé puis répliqué en une multitude de copies assemblées bout à bout, formant une longue molécule d'ADN bicaténaire nommée concatémère. Chaque unité de génome est liée à des séquences répétées et inversées riches en base AT (les séquences *pac*, *cis-acting packaging elements*)), qui sont des signaux de clivage et d'encapsidation (Mocarsky and Courcelle 2001).

iii. Encapsidation

L'encapsidation du génome viral fait appel à plusieurs protéines nommées les terminases. Ce sont des complexes hétéro-oligomériques qui permettent la reconnaissance, le clivage et la translocation des unités de génome dans les capsides néoformées. La reconnaissance des séquences *pac* par la protéine virale pUL56 permet le premier clivage de l'ADN et la fixation du complexe pUL56/ADN à la terminase pUL89. Le complexe pUL56/pUL89 se fixe ensuite à la protéine « portail » de la capsidie pUL104, qui permet le transfert de l'ADN viral dans la capsidie. Le complexe pUL56/pUL89 est responsable du 2^{ème} clivage de l'ADN, permettant sa libération dans la capsidie, puis se dissocie pour permettre une nouvelle encapsidation (Bogner et al. 1998).

iv. Tégumentation et libération des néovirions

Les protéines du tégument synthétisées au cours de la phase tardive de la réplication de l'ADN viral, et notamment pp28, pp71, pp150 et pp65, forment des amas qui s'agrègent autour des capsides pour former une substance amorphe, le tégument. Les nucléocapsides ainsi entourées du tégument sortent du noyau de la cellule hôte où elles acquièrent une première enveloppe, dérivée du feuillet interne, par bourgeonnement de la membrane nucléaire (Gibson 1996). Ces virions traversent la lumière, fusionnent avec le feuillet externe de la membrane nucléaire ou la membrane du réticulum endoplasmique, perdent leur première enveloppe et migrent dans le cytoplasme. Les virions deviennent alors matures par acquisition de leur tégument. Les capsides « tégumentées » reçoivent ensuite leur enveloppe définitive par liaison aux vésicules de Golgi (Sanchez et al. 2000). Les particules matures sont retenues dans ces vésicules et sont transportées à la surface de la cellule hôte *via* le réseau golgien. Après leur accumulation dans le cytoplasme, les virus infectieux sont sécrétés dans le milieu extracellulaire environ 72 heures post-infection (Landolfo et al. 2003).

II) Physiopathologie de l'infection à CMVH

a. Modes de transmission du cytomégalovirus

L'infection à CMVH est endémique et présente dans le monde entier. La transmission de ce pathogène opportuniste est interhumaine en raison de sa haute spécificité. Sa séroprévalence varie selon les zones géographiques et les groupes socio-économiques : 50 à 90 % d'individus sont porteurs du CMVH dans le monde (Staras et al. 2006). Le CMV est ubiquitaire. Il est capable d'infecter un grand nombre de types cellulaires (cellules endothéliales, épithéliales, fibroblastiques...).

La transmission du CMVH peut être horizontale, c'est-à-dire *via* les sécrétions corporelles : urines, sécrétions cervicales, lait, sperme, salive ou larmes. Le CMVH peut être transmis également par la voie iatrogène, c'est-à-dire par le sang et les organes de donneurs séropositifs au CMVH.

<i>In vitro</i>	<i>Fibroblastes</i> <i>Astrocytes</i> <i>Cellules musculaires lisses</i> <i>Cellules endothéliales</i> <i>Macrophages</i> <i>Cellules dendritiques</i> <i>Cellules épithéliales</i> <i>Trophoblastes</i> <i>Cellules stromales de la moelle</i> <i>Mégacaryocytes</i> <i>Cellules souches hématopoïétiques</i> <i>Hépatocytes</i>
<i>In vivo</i>	<i>Cellules épithéliales</i> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Glandes salivaires</i> - <i>Foie</i> - <i>Reins</i> - <i>Estomac</i> - <i>Intestin ...</i> <i>Rétinocytes</i> <i>Fibroblastes</i> <i>Astrocytes</i> <i>Cellules musculaires lisses</i> <i>Cellules endothéliales</i> <i>Macrophages</i> <i>Trophoblastes</i> <i>Endomyocarde</i> <i>Mésenchyme pulmonaire</i> <i>Cellules stromales de la moelle</i> <i>Hépatocytes</i>

Tableau 3 : Tropisme cellulaire du cytomégalovirus

(Modifié d'après Fish et al. 1996, 1998; Sinzger et al. 1996, 1999; Bodaghi et al. 1999; Fisher et al. 2000)

Le cytomégalovirus est la 1^{ère} cause d'infection congénitale virale ; on parle alors de transmission verticale. L'infection congénitale survient *in utero via* le placenta et conduit quelquefois à des villites chroniques, pathologies du placenta caractérisées par des foyers d'infiltrats inflammatoires lymphohistiocytaires (Sachdev et al. 1990; Nakamura et al. 1994). Le passage du virus à travers le placenta est encore mal connu. Il pourrait suivre deux directions : à travers les cytotrophoblastes extravilleux des villosités d'ancrage ou à travers les syncytiotrophoblastes des villosités flottantes vers l'espace intervilloux (Altshuler and McAdams 1971; Becroft 1981).

Un pour cent des nouveau-nés excrètent le virus dans les urines. L'infection peut être périnatale *via* le tractus génital ou lors de la délivrance par mélanges du sang maternel et fœtal ou post-natale *via* le lait maternel. Ce dernier mode de transmission reste le plus répandu dans le monde : 8 à 60 % des enfants sont infectés au cours de leur six premiers mois de vie par l'alimentation au lait maternel contaminé au CMVH (Reynolds et al. 1973; Stagno et al. 1984).

Certains sujets sont hautement contamineurs en raison de leur excrétion virale en grande quantité et/ou sur des périodes prolongées. C'est notamment le cas des sujets dont la primo-infection est récente ou de patients souffrant de déficits immunitaires. En effet, les principales sources du virus sont les enfants infectés *in utero*, chez lesquels le virus est retrouvé en grande quantité dans la salive et l'urine au cours des premiers mois de la vie ; et les immunodéprimés, en raison de leur capacité diminuée à juguler les infections actives (Mayaud et al. 1999).

b. Tropisme cellulaire du cytomégalovirus (Tableau 3)

L'acquisition du virus CMVH par les voies respiratoires, sexuelles, sanguines ou materno-fœtales est suivie par une dissémination sanguine au cours de laquelle le virus se propage aux organes. *In situ*, le CMVH est capable d'infecter une grande variété de cellules telles que les macrophages/monocytes/dendritiques, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules stromales, les neutrophiles, les hépatocytes (Plachter et al. 1996; Sinzger and Jahn 1996), les cellules progénitrices neuronales, les neurones et les astrocytes (Luo et al. 2008). La phase de contamination systémique s'accompagne d'une excrétion virale persistante dans les liquides biologiques, à l'origine de contaminations.

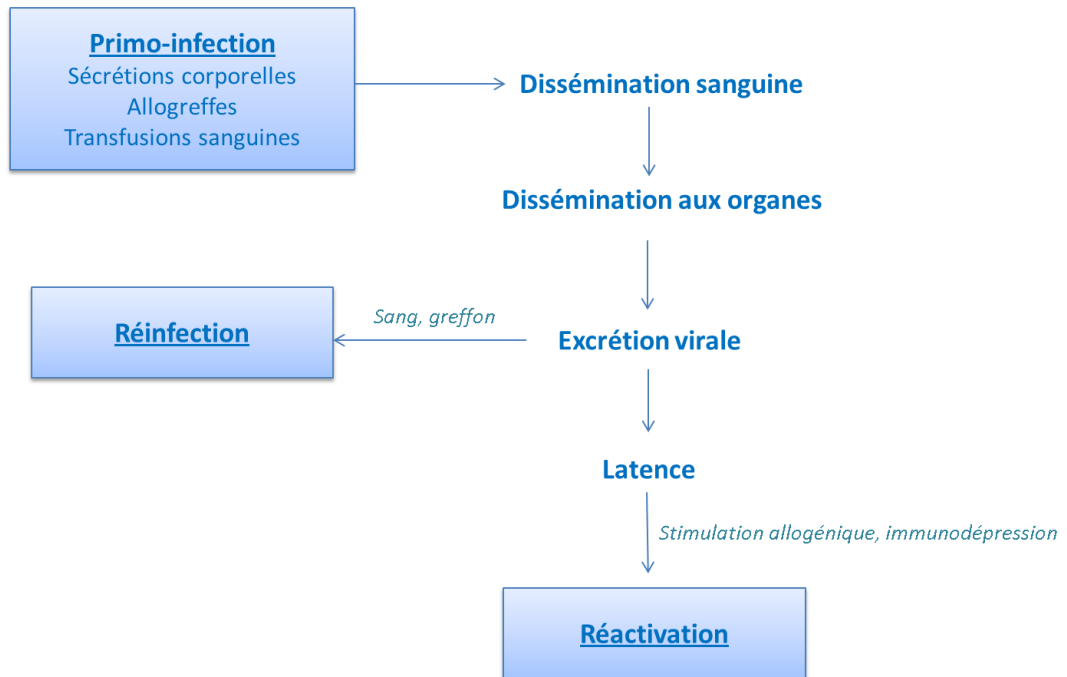


Figure 5 : Physiopathologie de l'infection à CMVH

Du fait de la distribution ubiquitaire des cibles cellulaires du virus, tout organe peut être atteint. En effet, l'estomac, le foie, l'intestin et les reins sont souvent le siège de manifestations pathologiques.

Cependant, le tropisme cellulaire diffère entre les souches cliniques et les souches de laboratoire. Ce tropisme cellulaire est basé sur un îlot génétique de tropisme comprenant trois ORF : *UL128*, *UL130* et *UL131A*. Ces trois gènes seraient actifs dans les souches cliniques mais inactifs dans les souches de laboratoire, perdus après de nombreux passages sur fibroblastes (Jarvis and Nelson 2007).

c. Latence et réactivation (Figure 5)

La latence est une des caractéristiques majeures des infections à *Herpesviridae*. Les sites de latence du CMV sont multiples. En effet, ce virus peut être retrouvé sous forme latente dans les monocytes du sang périphérique, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses ainsi que dans les progéniteurs des macrophages et des cellules dendritiques (Sinclair and Sissons 1996; Hahn et al. 1998).

La latence virale est rendue possible par inhibition de la division cellulaire et ainsi inhibition de la réplication productive de virus. La réactivation du virus survient en réponse à une immunodépression, une inflammation, une infection ou un stress (Mutimer et al. 1997; Kutza et al. 1998; Prosch et al. 2000).

A l'heure actuelle, les mécanismes de réactivation du CMV ne sont pas bien établis. La réactivation virale pourrait être activée par stimulation allogénique. En effet, le système immunitaire favorise la réactivation du virus en synthétisant des cytokines telles que le Tumor Necrosis Factor, TNF- α ou l'interféron IFN- γ conduisant à la transcription des gènes *Immediate Early* du CMV (Stein et al. 1993; Prosch et al. 1995; Soderberg-Naucler et al. 1997). La réactivation du CMV peut également se produire suite à un stress *via* la libération de catécholamines, d'épinéphrine ou de norépinéphrine (Prosch et al. 2000) ou *via* la libération des prostaglandines pro-inflammatoires (Kline et al. 1998), conduisant à l'augmentation d'AMPc qui stimule à son tour le promoteur *IE*.

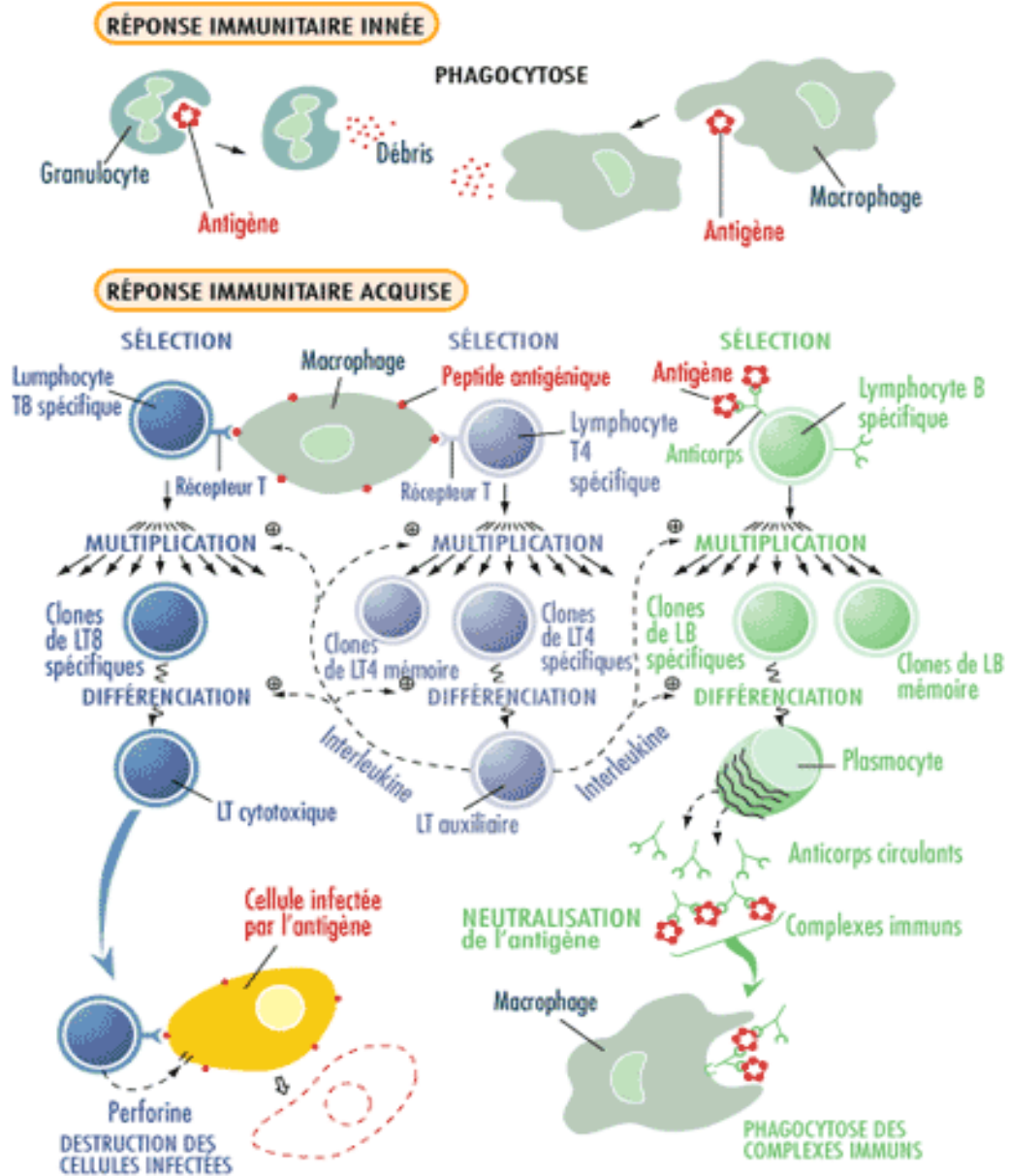


Figure 6 : Réponses immunitaires innée et acquise

d. Système immunitaire et CMV

L'infection à CMV conduit à l'activation d'une réponse immunitaire qui confère au patient une protection contre le virus. En revanche, lorsque le virus persiste dans l'organisme à l'état de latence, le système de défense n'est pas capable de le détecter et ainsi de l'éliminer.

Suite à une primo-infection, le système immunitaire combat le virus par deux mécanismes, l'immunité innée et l'immunité adaptative. Cette dernière regroupe la réponse humorale et la réponse à médiation cellulaire, faisant intervenir les lymphocytes T CD4, CD8 et $\gamma\delta$.

L'infection CMVH peut débiter par sa liaison aux récepteurs « Toll-Like Receptor » (TLR), ce qui active diverses voies de transduction. En effet, la liaison CMV/TLR conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, qui recrutent des cellules de l'immunité innée, et à la sur-régulation de molécules co-stimulantes telles que les CD80 et CD86, qui permettent l'activation de l'immunité adaptative.

i. Immunité innée (Figure 6)

In vivo, il a été montré que la liaison de CMV murin aux TLR9 et TLR3 conduit à la production d'IFN- α et β *via* les cellules dendritiques et les macrophages, et permet ainsi l'activation des cellules Natural Killer (NK) (Tabeta et al. 2004; Delale et al. 2005; Hokeness-Antonelli et al. 2007). Ces cellules lymphoïdes exercent une action cytotoxique sur les cellules infectées qui présentent une altération de l'expression des molécules de classe 1 du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

La liaison du complexe de glycoprotéines virales gB/gH aux TLR2 conduit également à la production de cytokines pro-inflammatoires (Compton et al. 2003; Boehme et al. 2006).

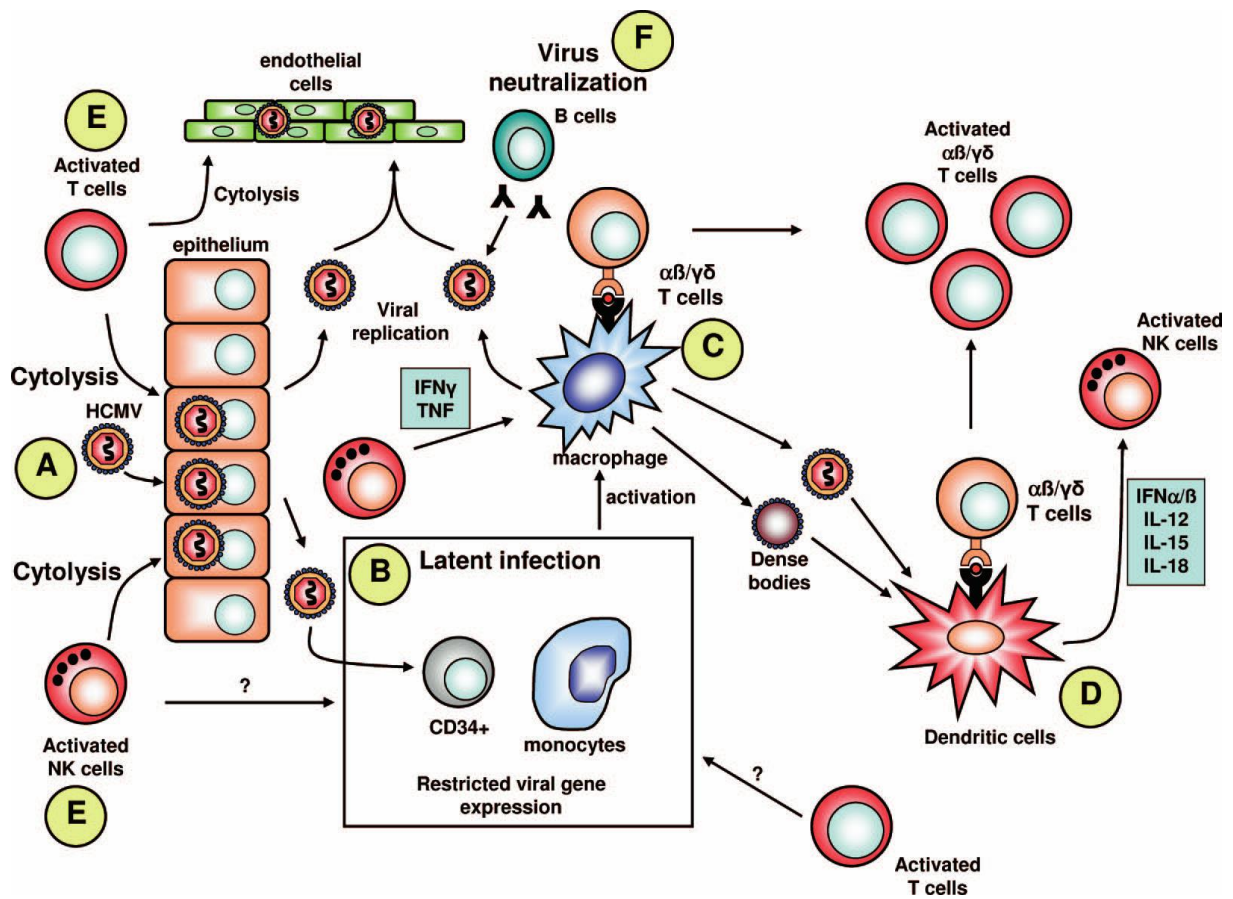


Figure 7 : CMVH et systèmes immunitaires inné et adaptatif

(D'après Crough et al. 2009)

ii. Immunité adaptative (Figure 7)

Réponse humorale

Les anticorps ne jouent qu'un rôle modeste dans l'immunité anti-CMV. En effet, ces immunoglobulines ont un impact restreint sur la dissémination et la réplication du virus, car seules les particules virales extracellulaires peuvent être la cible de ces anticorps neutralisants. Sachant que la propagation virale se fait essentiellement par passage de cellule à cellule, la faible libération des virions dans le milieu extracellulaire ne permet pas une réponse humorale suffisamment intense pour combattre le virus (Segondy and Salhi 1995). Dans 50 % des cas, la cible de ces anticorps est la gB, glycoprotéine virale intervenant dans l'attachement et la pénétration du virus dans la cellule hôte (Marshall et al. 1992). La glycoprotéine gH qui intervient dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, active également la réponse humorale (Rasmussen et al. 1991).

Réponse médiée par les lymphocytes T

En réponse à l'infection, l'immunité médiée par les cellules T a une action prédominante contre la réplication virale CMVH. Bien que le virus ne soit pas éradiqué par la réponse immune, les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et $\gamma\delta$ jouent un rôle important dans le contrôle et la limitation de la réplication du CMV.

○ Rôle des CD4⁺

Les lymphocytes LT CD4⁺ ou *helper* jouent un rôle central voire indispensable dans l'immunité adaptative, en activant la réponse humorale ainsi que la réponse cytotoxique *via* les LT CD8⁺. Bien que les réponses anticorps et LT CD8⁺ soient fonctionnelles, l'absence de CD4⁺ ne permet pas de contrôler la réplication virale (Gamadia et al. 2004). En effet, un déficit immunitaire touchant les CD4⁺ induit par des traitements immunosuppresseurs, s'accompagne d'infections à CMV persistantes, souvent cliniquement sévères, traduisant ainsi l'absence de contrôle du système immunitaire.

Suite à l'infection CMV, les LT *helper* reconnaissent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (macrophages, cellules dendritiques ou lymphocytes B) les épitopes spécifiques du CMV *via* leur récepteur T-Cell Receptor (TCR). L'internalisation du complexe TCR/antigène, sous l'action de l'interleukine 1 produite par les CPA, va conduire à la production de clones de LT CD4⁺ *helper* spécifique à l'épitope détecté du CMV. Ces LT vont activer la réponse T cytotoxique *via* leur production de cytokines telles que l'interleukine 2, 12 ou l'IFN- γ , et activer les lymphocytes B *via* leur sécrétion d'interleukines IL-4, 5, 10 et 13.

- **Rôle des CD8⁺**

Les lymphocytes T CD8⁺ exercent une activité cytotoxique sur les cellules infectées par le CMV. Dans des modèles murins, il a été montré que ces lymphocytes jouent un rôle anti-CMV indispensable. En effet, l'élimination de ces cellules coïncide avec une augmentation du niveau de réactivation et de dissémination de l'infection virale (Reddehase et al. 1985).

L'activité des lymphocytes CD8⁺ est dépendante de cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-2, produites par les LT CD4⁺ (Gamadia et al. 2003). Suite à cette stimulation, les LT CD8⁺ vont produire des médiateurs cytotoxiques tels que la perforine et le granzyme B qui vont alors entraîner des lésions membranaires sur la cellule hôte. Les lymphocytes T CD8⁺ mémoire, sensibilisés aux protéines du CMV, persistent dans l'organisme.

Chez les patients immunocompétents, les réponses T *helper* et cytotoxique dirigées contre le CMV se maintiennent à un niveau élevé, ce qui est probablement indispensable au contrôle de la réplication virale par le système immunitaire. La persistance d'un niveau élevé de ces réponses LT pourrait traduire une stimulation répétée du système immunitaire, par exemple, par de nombreuses réactivations virales.

- **Rôle des $\gamma\delta$**

Les lymphocytes LT $\gamma\delta$ représentent moins de 6 % des lymphocytes T dans le sang chez les humains. Néanmoins, ils jouent un rôle clef dans le système immunitaire contre les infections virales telles que celles à herpès simplex de type 1 (Sciammas et al. 1997) ou au CMV.

Chez les patients ayant reçu une greffe de rein, l'augmentation de LT de 5 à 40 % des LT totaux est corrélée à l'infection de CMV (Dechanet et al. 1999). Le niveau d'antigénémie élevé est associé à la sévérité des maladies à CMV (Lafarge et al. 2001).

Ces lymphocytes ont montré une efficacité contre le cytomégalo virus murin MCMV (Ninomiya et al. 2000; Cavanaugh et al. 2003). Les souris infectées par le MCMV présentent une accumulation de LT $\gamma\delta$ dans les glandes salivaires (Cavanaugh et al. 2003). L'épuisement de ces lymphocytes conduit à une augmentation de la charge virale de CMV chez les souris (Ninomiya et al. 2000).

iii. Echappement du CMV au système immunitaire

Le CMV, comme la plupart des herpès virus, possède une multitude de stratégies visant à défier le système immunitaire. Lors de la phase précoce de l'infection, la protéine kinase virale pp65 phosphoryle la protéine *Immediate Early 1* (Gilbert et al. 1996). Celle-ci bloque à son tour le processus de présentation des antigènes dérivés d'I.E *via* les molécules CMH de type 1 conduisant ainsi à inhiber la réponse des LT cytotoxiques spécifiques aux I.E de type 1 (Gilbert et al. 1993; Gilbert et al. 1996). De la même manière, le CMV inhibe l'expression membranaire des molécules de classe 1, *via* l'expression des gènes viraux *US2*, *US3*, *US10* et *US11* qui sont responsables de la séquestration et la dégradation des molécules de classe 1 dans la cellule infectée *via* le protéasome (Furman et al. 2002b; Furman et al. 2002a).

Dans les cellules infectées par le CMV, la présentation de l'antigène à travers les molécules du CMH de type 2 est inhibée, suite à la libération d'IFN- γ , *via* l'expression des gènes viraux *US2* et *via* l'expression des protéines I.E et E (Miller et al. 1998; Miller et al. 1999).

L'action inhibitrice du CMV sur l'expression des molécules de classe 1 et 2 altère probablement l'intensité des réponses T helper et cytotoxique spécifiques du CMV.

L'inhibition de l'expression des molécules de classe 1 devrait rendre les cellules infectées plus sensibles à l'action des cellules NK. Au contraire, les gènes *UL18* et *UL40* du CMV codent des analogues de molécules du CMH de classe 1 qui sont exprimés à la surface des cellules infectées et qui se lient avec le récepteur NKG2A/CD94 des NK. Les analogues provoquent ainsi l'inhibition de l'activité cytotoxique des NK (Reyburn et al. 1997; Tomasec et al. 2000).

<i>Systèmes - organes touchés</i>	<i>Pathologies associées</i>
➤ <i>Fièvre prolongée</i>	Céphalées, Myalgies, Syndrome mononucléosique, Cytolyse
✚ Atteintes Neurologiques	Syndrome de Guillain-Barré, Encéphalite, Myélite, Encéphalomyéloradiculite, Méningites, Rhombencéphalites
✚ Atteintes Digestives Foie, Œsophage, Estomac, Intestin grêle, Côlon	Hépatite cholestasique, Oesophagite ulcérée, Gastrite, Ulcères, Iléite, Entéropathie exsudative, Colite ulcéreuse
✚ Atteintes Cardiovasculaires	Myocardite, Péricardite (rare)
✚ Atteintes Pulmonaires	Toux sèche, Pneumopathie
✚ Atteintes Hématologiques	Thrombopénie, Anémie hémolytique (rare)
✚ Atteintes Dermatologiques	Rash cutané type morbilliforme ou rubéoliforme, Purpura, Lésions érythémateuses avec desquamation
✚ Atteintes Ophtalmologiques	Rétinite, Uvéite, Chorioretinite, Conjonctivites
➤ <i>Infections sévères à CMV</i>	
✚ Atteintes Multiviscérales	Atteinte grave hépatique, pulmonaire, système nerveux central ...

Tableau 4 : Manifestations cliniques chez l'immunocompétent

Le CMV code une variété de protéines associées à l'échappement au système immunitaire. En effet, quatre gènes du CMV (*UL33*, *UL78*, *US27* et *US28*) codent des homologues du récepteur des protéines G à 7 domaines transmembranaires (Chee et al. 1990; Margulies et al. 1996), un homologue de l'IL-10 (*UL111a*) (Kotenko et al., 2000), un récepteur viral TNF (*UL144*) (Benedict et al. 1999) ; ainsi que des agents anti-apoptotiques (*UL36*, *UL37*) (Goldmacher et al. 1999; Skaletskaya et al. 2001).

Le cytomégalovirus est capable d'altérer par différents mécanismes les réponses immunitaires dirigées contre lui. La persistance du virus résulte donc d'un équilibre subtil entre le virus et le système de défense, démontrant la remarquable adaptation du virus à son hôte.

e. Manifestations cliniques et épidémiologie

i. Infection chez le patient immunocompétent

La primo-infection à cytomégalovirus chez le patient immunocompétent passe souvent inaperçue puisqu'elle est le plus souvent asymptomatique (dans 90 % des cas). Les manifestations cliniques, lorsqu'elles existent, vont d'une fièvre isolée et spontanément régressive jusqu'aux formes graves nécessitant un traitement antiviral et/ou une hospitalisation. Le cytomégalovirus peut engendrer chez le patient sain des manifestations cliniques : neurologiques, digestives, cardiovasculaires, pulmonaires, hématologiques, dermatologiques ou ophtalmologiques (Tableau 4) associées à une fièvre prolongée (généralement > 39°C).

ii. Infection chez le patient immunodéprimé (Tableau 5)

✚ Séropositifs VIH

La maladie à cytomégalovirus au cours du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) est une conséquence de la réactivation endogène de l'infection à CMV induite par l'immunodépression sévère du SIDA.

<i>Systèmes - organes touchés</i>	<i>Pathologies associées</i>
✚ Système digestif	Hépatite
✚ Œil	Rétinite
✚ Système nerveux central	Encéphalite, Ventriculoencéphalite
✚ Système nerveux périphérique	Myélite, Myéloradiculite Neuropathie multifocale
✚ Poumons	Pneumonie
✚ Peau	Dermatose
✚ Pancréas	Pancréatite
✚ Cœur	Myocardite
✚ Appendice	Appendicite

Tableau 5 : Manifestations cliniques chez le patient VIH⁺

<i>Systèmes - organes touchés</i>	<i>Pathologies associées</i>
✚ Foie	Hépatite
✚ Poumons	Pneumonie
✚ Reins	Néphrite
✚ Moelle osseuse	Thrombocytopénie
✚ Système lymphatique	Lymphadénopathie

Tableau 6 : Manifestations cliniques chez le transplanté d'organes

Au sein de la population de patients séropositifs VIH, la séroprévalence pour le CMV est très élevée (environ 85 %) (Robain et al. 1998). Elle dépend de la voie de contamination : > 95 % chez les patients infectés par voie sexuelle contre 75 à 78 % chez patients toxicomanes (infection *via* voie intraveineuse). Dans 70 % des cas, la rétinite est la principale manifestation clinique chez ces patients (Casado et al. 1999). L'infection à CMV peut provoquer des atteintes digestives dans l'ensemble du tube digestif (15 à 30 %) et neurologiques (5 à 10 %). Les systèmes nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) peuvent être touchés par le CMV (pathologies associées au SNC : encéphalite, ventriculoencéphalite ; pathologies associées au SNP : myélite, myéloradiculite, neuropathie multifocale) (McCutchan 1995). Chez ces patients, le CMV peut également atteindre d'autres organes mais de manière plus rare : pneumonies <5 % des cas ; atteinte cutanée, pancréatique, myocardite, appendicite.

Transplantés d'organes (Tableau 6)

L'infection à CMV est responsable d'une grande morbi-mortalité chez les patients receveurs d'organes. Environ 60 % des transplantés sont séropositifs au CMV. Parmi eux, 50 % développent une infection à CMV et 25 % une maladie à CMV. Lorsque le donneur est CMV négatif, le risque de développer une infection est de 60 %, ou de développer une maladie à CMV est de 30 à 50 %. Généralement, chez le patient transplanté, l'infection survient pendant la 1^{ère} année suivant la fin de traitement prophylactique anti-CMV. Le risque d'infection du transplanté et les manifestations cliniques associées dépendent du niveau d'immunosuppression ainsi que de l'organe transplanté (Razonable; Duncan et al. 1991; Ettinger et al. 1993; Zamora 2004; Humar et al. 2005) (Tableau 7). De la même manière que pour les patients immunocompétents, l'infection peut être asymptomatique ou symptomatique (fièvre associée à : hépatite, lymphadénopathie, thrombocytopénie, pneumonie, pancréatite, néphrite...) (Fishman 2007).

L'infection à CMV est également associée à des effets indirects : rejet du greffon, athérosclérose accélérée ou co-infection, qui réduisent aussi bien la viabilité de l'organe transplanté que la survie du patient. Il a été montré que le CMV peut agir comme un co-facteur dans la progression du SIDA, *via* l'activation de promoteurs cellulaires ou viraux par ses protéines *Immediate Early* (Davis et al. 1987; Robain et al. 2001).

Organes transplantés	CMV Donneur ⁺ /Receveur ⁻	CMV Receveur ⁺
Reins - pancréas	45 à 65 %	8 à 10 %
Foie	45 à 65 %	8 à 19 %
Cœur	29 à 74 %	20 à 40 %
Poumons	40 à 92 %	54 à 60 %

Tableau 7 : Incidence de l'infection à CMVH chez les transplantés d'organes

(Modifié d'après Duncan et al. 1991; Ettinger et al. 1993; Zamora et al. 2004; Humar et al. 2005; Razonable et al. 2010)

Systèmes-organes touchés	Symptômes
✚ Pancréas	Pancréatique
✚ Moelle osseuse	Insuffisance médullaire
✚ Système digestif	Ulcère muqueuse épithélium
✚ Sang	Cystite hématurique
✚ Système nerveux central	Encéphalite (rare)
✚ Œil	Rétinite (rare)
✚ Poumons	Pneumonie

Tableau 8 : Manifestations cliniques chez le receveur de cellules souches hématopoïétiques

Receveurs de cellules souches hématopoïétiques (Tableau 8)

Lors de greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques, le risque d'infection et/ou de maladie à CMV est élevé. En effet, le système immunitaire du receveur de la greffe est fortement inhibé ainsi que la stimulation allogénique des cellules mononucléées ce qui favorise la réplication et la propagation virale.

La pneumonie à CMV est la manifestation clinique la plus fréquente et la plus grave chez ces patients transplantés. Avant l'apparition de traitements antiviraux efficaces, elle survenait chez 10 à 30 % des receveurs d'allogreffes, et était responsable de 85 à 95 % de décès. A l'heure actuelle, la pneumonie à CMV est rare en raison des progrès effectués dans la prise en charge de la maladie (détection rapide de l'infection à CMV avant le développement de la maladie ; traitements efficaces). Depuis, l'insuffisance médullaire est devenue la première cause de morbidité et de mortalité liée à l'infection à CMV. Ce virus touche également le tube digestif (ulcères de la muqueuse de l'épithélium digestif), la vessie (cystite hématurique), le foie, le système nerveux central (encéphalite, très rare), l'œil (rétinite, extrêmement rare) (Devergie et al. 1994).

iii. Infection congénitale, pré et post-natale

Le cytomégalovirus humain est la première cause d'infections virale intra-utérine et périnatale dans le monde (Numazaki and Chiba 1997). Il est la première cause de surdité et de déficit intellectuel d'origine virale, affectant 0,5 à 2,5 % des nouveau-nés (Stagno et al. 1986; Fowler et al. 1992; Revello et al. 2002). Dans ce contexte, il peut être transmis par trois voies distinctes : *via* le placenta (**infection congénitale**) ; *via* les sécrétions génitales de la mère lors de l'accouchement (**infection périnatale**) (Alford et al. 1990) ; ou *via* l'allaitement (**infection post-natale**) (Stagno et al. 1980; Vochem et al. 1998).

Les manifestations cliniques liées à l'infection à CMV chez le fœtus et le nouveau-né sont nombreuses : retard de croissance intra-utérin, microcéphalie, hépatomégalie, splénomégalie, pneumonie, calcifications ventriculaires du cerveau.

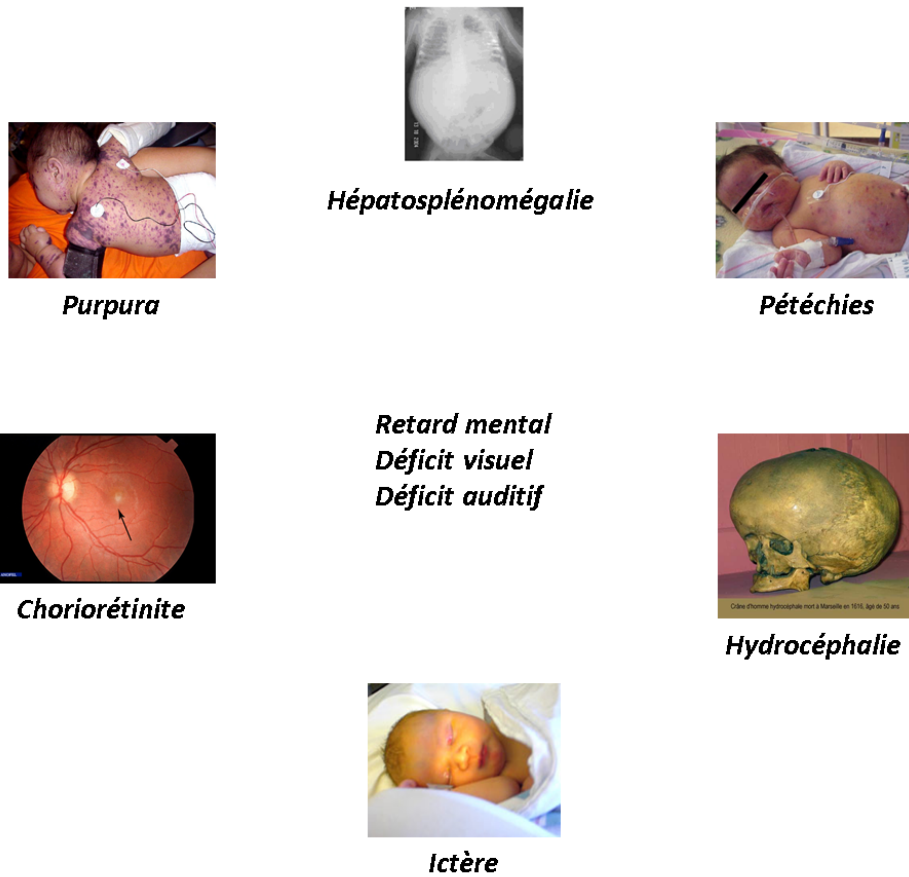


Figure 8 : Manifestations cliniques chez le fœtus et le nouveau-né

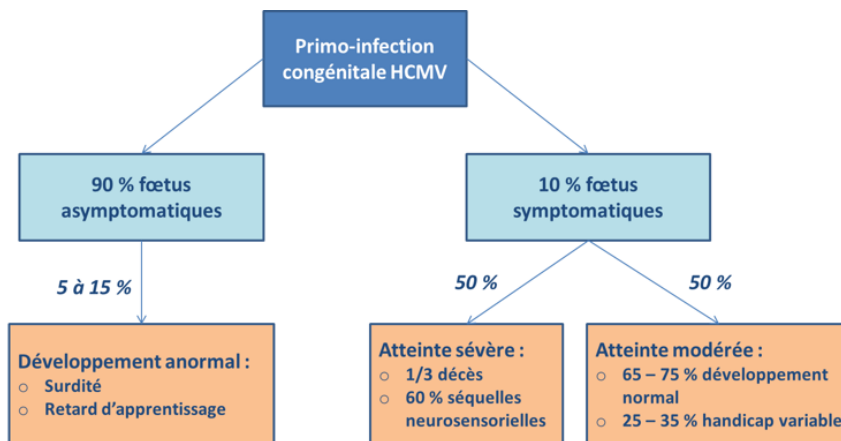


Figure 9 : Epidémiologie de l'infection congénitale

(Modifiée d'après Stagno et al. 1986; Peckham et al. 1987; Ramsay et al. 1991; Fowler et al. 1992)

Les complications tardives liées à l'infection du fœtus et du nouveau-né sont : ictère néonatal prolongé, épilepsie, chorioretinite, atrophie optique, purpura, pétéchies, retard psychomoteur, retard de langage, problème d'apprentissage ou déficits neurosensoriels (Peckham 1989) (Figure 8).

Lors de primo-infections de la mère, 40 % des nouveau-nés sont contaminés par voie intra-utérine (Burton and Watson 1997), dont 10 à 15 % des enfants présentent une infection symptomatique à la naissance (1/6 décèdent, 2/6 présentent des séquelles sévères : microcéphalie, calcifications intracrâniennes et 3/6 présentent des séquelles modérée : surdité dans 30 à 65 % des nouveau-nés) et 90 % sont asymptomatiques (Peckham 1989). Parmi ces derniers, 5 à 15 % développent des séquelles neurologiques dans les premières années de la vie caractérisées par un retard mental, une surdité (Williamson et al. 1982; Stagno et al. 1986; Peckham et al. 1987; Ramsay et al. 1991; Fowler et al. 1992) (Figure 9).

Lors d'infections post-natales, 40 à 96 % des mères séropositives transmettent le CMV au nouveau-né *via* l'allaitement (Meir 2005). La sécrétion de virus dans le lait semble débiter la première semaine *post-partum* avec une faible charge virale, atteindre un maximum dans les 4 à 8 semaines suivant l'accouchement pour enfin décliner entre les semaines 9 à 12 post-accouchement. En revanche, le mécanisme et le site de réactivation du CMV dans le lait ne sont pas connus à l'heure actuelle. Suite à l'ingestion de lait contaminé, le virus est capable d'infecter l'œsophage, le pharynx ainsi que les voies aériennes supérieures (Stagno et al. 1982).

Bien que l'immunité maternelle réduise la fréquence de transmission virale mère/fœtus (1 % en cas d'immunisation maternelle antérieure à la grossesse), la sévérité de la maladie à CMV est similaire voire inférieure chez les nouveau-nés entre les infections récurrentes ou primaires (Stagno et al. 1982; Ahlfors et al. 1999; Boppana et al. 1999; Ahlfors et al. 2001; Boppana et al. 2001). En revanche, dans 42 % des cas, une primo-infection conduit à l'avortement spontané du fœtus, contre 19 % lors d'infection récurrente (Rahav et al. 2007).

III) Diagnostic de l'infection à CMV

Le diagnostic de l'infection à cytomégalo virus permet de définir et de limiter les risques liés à l'infection et aux maladies à CMV.

Le choix de la détermination du diagnostic dépend du statut de chaque patient. Le choix de la recherche parmi les différents marqueurs virologiques est particulier à chaque cas clinique : patient sidéen, patient transplanté ou suspicion d'infection congénitale. Dans tous les cas, il est capital de différencier l'infection active de l'infection latente.

Plusieurs techniques de détection et/ou de quantification peuvent être utilisées : la détection de virus sur culture de fibroblastes, la détection d'antigènes par immunofluorescence, la détection d'acides nucléiques par PCR en temps réel ou la détection d'immunoglobulines dans le sang des patients (sérologie).

a. Techniques de détection de l'infection à CMVH

En fonction des circonstances cliniques observées chez le patient, le choix des prélèvements est différent. La présence du virus ou de ses structures (antigènes et acides nucléiques) peut être recherchée dans diverses liquides biologiques (sang, sécrétions pharyngées, urine, liquide céphalorachidien, liquide amniotique, humeur aqueuse) ou tissus (biopsies tissulaires : digestive, pulmonaire, cérébrale, hépatique ...).

Le sang est un prélèvement de choix car la présence de CMV dans ses compartiments (sang total, cellules, plasma ou sérum) caractérise une infection active. Les urines et les sécrétions pharyngées, fréquemment sites d'excrétion du virus, sont également des prélèvements de choix.

i. Culture cellulaire

La culture cellulaire est une technique de référence qui permet d'affirmer la présence de virus au niveau du site de prélèvement (urine, salive...). La culture de CMV est effectuée sur des fibroblastes embryonnaires humains. Dans ces cellules, le virus est capable de se répliquer rapidement et en grande quantité. L'infection se traduit par la présence de foyers cytopathiques dits « en banc de poissons » détectables au microscope optique ou par détection d'antigènes par immunocytochimie (anticorps anti-*Immediate Early Antigen*) (Figure 10).

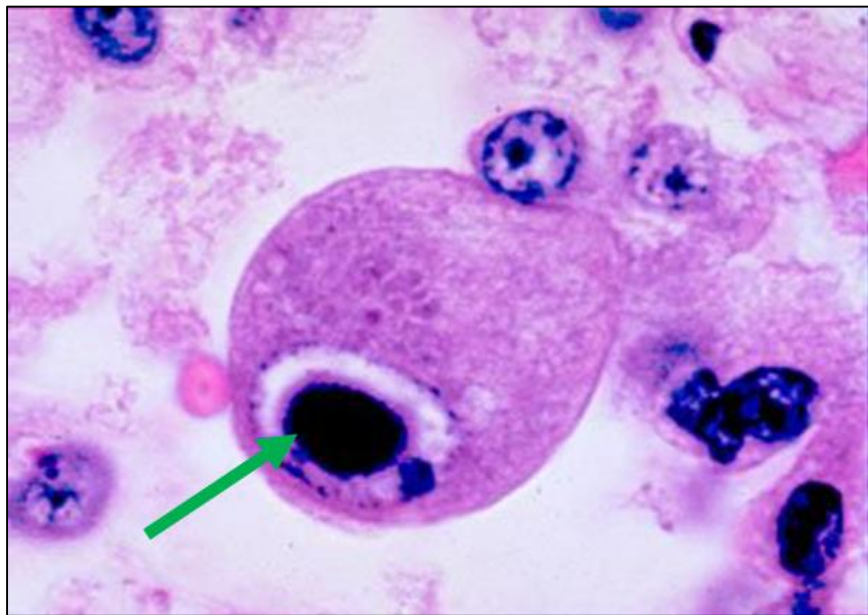
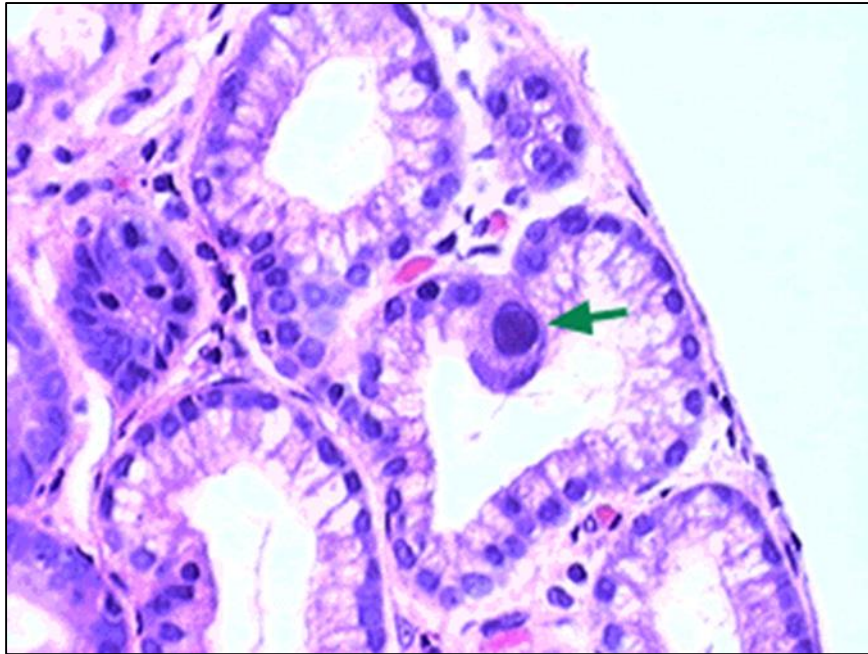


Figure 10 : Effet cytopathique du CMVH

(Modifiée d'après <http://blog.designsforhealth.com/blog/bid/156662/The-Cytomegalovirus-aka-CMV>; <http://www.histopathology-india.net/CMV.htm>)

ii. Antigénémie pp65 (détection des antigènes viraux dans le sang)

La protéine virale pp65 est une phosphoprotéine tardive captée dans les polynucléaires circulants au contact des cellules endothéliales infectées. Elle constitue un marqueur de choix de l'infection active dans le sang des patients. Elle est détectée par immunofluorescence ou immunoperoxydase.

iii. Antigènes viraux dans les autres prélèvements

Des antigènes viraux intracellulaires peuvent être recherchés directement à partir de prélèvements tissulaires *via* des coupes histologiques de biopsies ou *via* des cellules extraites par ponction de liquide amniotique. La révélation du virus est effectuée par fluorescence à l'aide d'anticorps anti-antigènes très précoces, précoces ou tardifs.

iv. Acides nucléiques viraux

La recherche d'ADN viral par Polymerase Chain Reaction (PCR) peut être effectuée dans tous les prélèvements, aussi bien liquides que tissulaires. Cette technique consiste à amplifier en grand nombre un fragment du génome à l'aide d'une enzyme, la taq polymérase et d'amorces spécifiques. L'ADN viral peut être quantifié par PCR en temps réel. L'amplification du génome est alors effectuée en ajoutant une sonde spécifique au mélange réactionnel (Technologie Taqman) puis comparée à une gamme étalon.

v. Sérologie CMV

L'infection virale peut également être détectée dans le sang par recherche des immunoglobulines anti-CMV par la technique Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA).

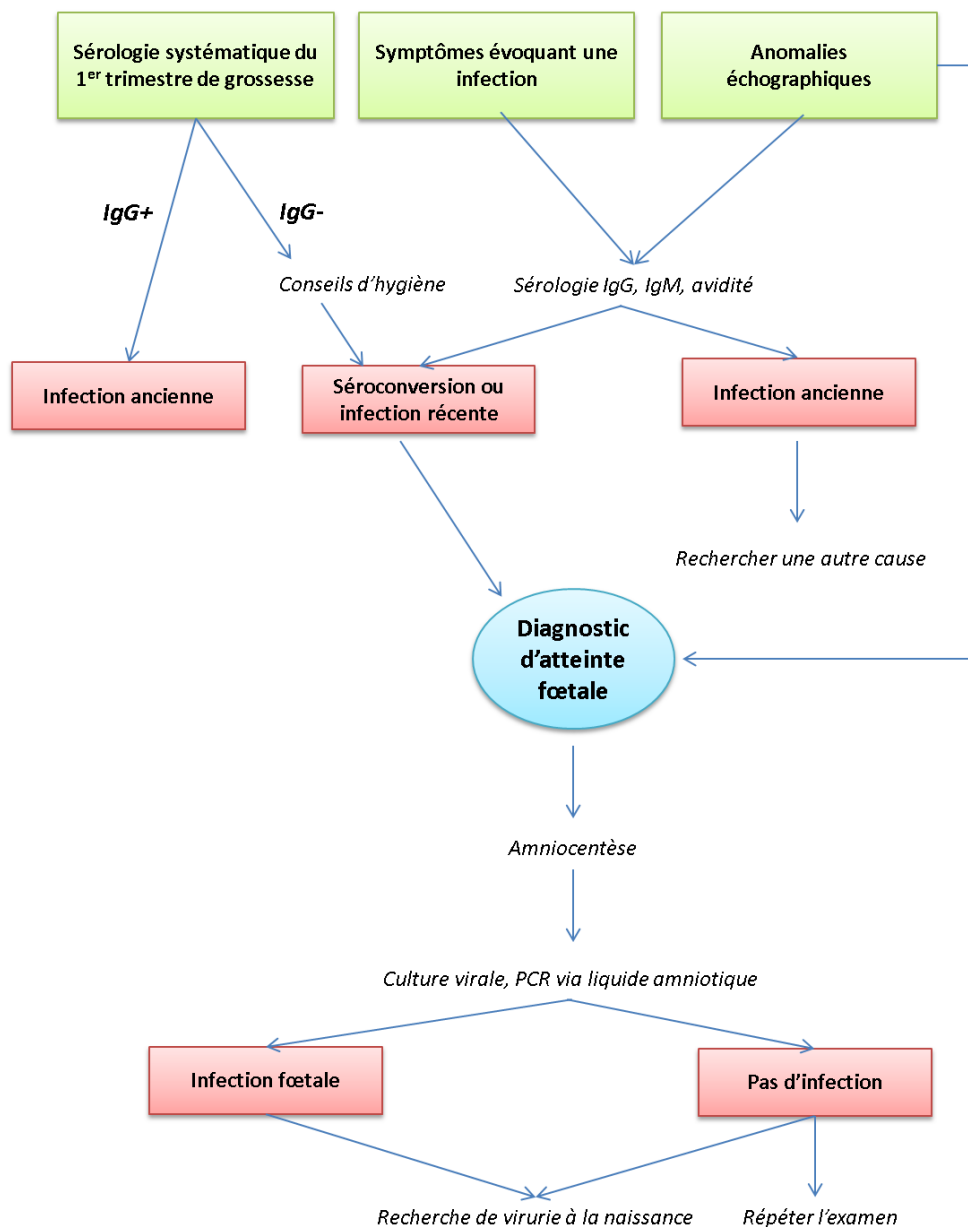


Figure 11 : Diagnostic de l'infection à CMVH au cours de la grossesse

Plusieurs anticorps, jouant un rôle important dans la réponse immunitaire humorale, sont sélectionnés pour la détermination de l'infection précoce ou tardive. En effet, la protéine accessoire pUL44 de l'ADN polymérase virale est la cible d'une réponse IgM précoce. Elle est donc recherchée comme diagnostic de l'infection précoce. Toutefois, la présence d'IgM n'est pas toujours un marqueur de primo-infection. En effet, les IgM peuvent persister dans le sang pendant plusieurs mois ou être le résultat d'infections secondaires. D'autres protéines détectées *via* ELISA permettent d'affirmer la séropositivité d'une infection à CMV, telles que les protéines de la matrice : pUL32, pUL83 ou pUL99.

b. Méthodes diagnostiques de l'infection en fonction du patient

i. Infection chez l'immunocompétent

Chez l'immunocompétent, le diagnostic sérologique associe la recherche d'IgG et d'IgM anti-CMV. Les IgG apparaissent tardivement, 6 à 8 semaines post-primo-infection. La virémie et l'antigénémie sont détectées dans les 2 à 3 semaines suivant l'infection ; et l'ADNémie leucocytaire peut persister jusqu'à 6 mois post-infection dans ¼ des cas.

ii. Infection maternofoetale

✚ Chez la femme enceinte (Figure 11)

Bien que le CMV soit la première cause d'infection congénitale virale, son dépistage au cours de la grossesse n'est pas systématique (Guerra et al. 2000; Azam et al. 2001). La sérologie CMV n'est prescrite que suite à une suspicion clinique ou échographique. Toutefois, la détection d'une infection active chez la mère ne permet pas d'affirmer une future infection congénitale. Notons que l'amniocentèse peut augmenter le risque de transmission du cytomégalovirus maternel au fœtus, si la mère présente une virémie CMV.

Chez le fœtus

Le diagnostic de référence de l'infection prénatale *in utero* est effectué à partir du liquide amniotique. Il repose sur la recherche de virus par culture cellulaire ou PCR. Le moment exact où le virus traverse la barrière placentaire est inconnu. Il semblerait se situer entre la 2^{ème} et la 12^{ème} semaine post-primoinfection de la mère. De ce fait, la détection dans le liquide amniotique est réalisée au minimum 4 semaines après la séroconversion de la mère.

Le virus peut aussi être détecté dans le sang fœtal. En cas de mort fœtale, les tissus fœtaux peuvent être analysés pour diagnostiquer la présence ou non du cytomégalovirus.

L'ensemble de ces techniques virologiques permet de diagnostiquer l'infection fœtale à CMVH, mais ne permet pas de prédire l'importance des séquelles de l'infection chez le fœtus ou le nouveau-né.

Chez le nouveau-né

Dès la suspicion d'une infection congénitale chez un nouveau-né, une recherche de virurie (détection du virus dans les urines) est indispensable. Notons que l'infection est acquise *in utero*, si le virus est détecté avant la troisième semaine de vie de l'enfant *via* la salive ou les urines. En revanche, la détection du virus après les trois premières semaines de la vie du nourrisson, peut révéler une infection *per* ou *post-natale* : passage du virus *via* le tractus génital, *via* le mélange du sang maternel et fœtal au cours de l'accouchement ou *via* le lait maternel lors de l'allaitement.

Chez les enfants symptomatiques (10 % des cas), le virus peut aussi être détecté dans le liquide céphalorachidien ou le sang.

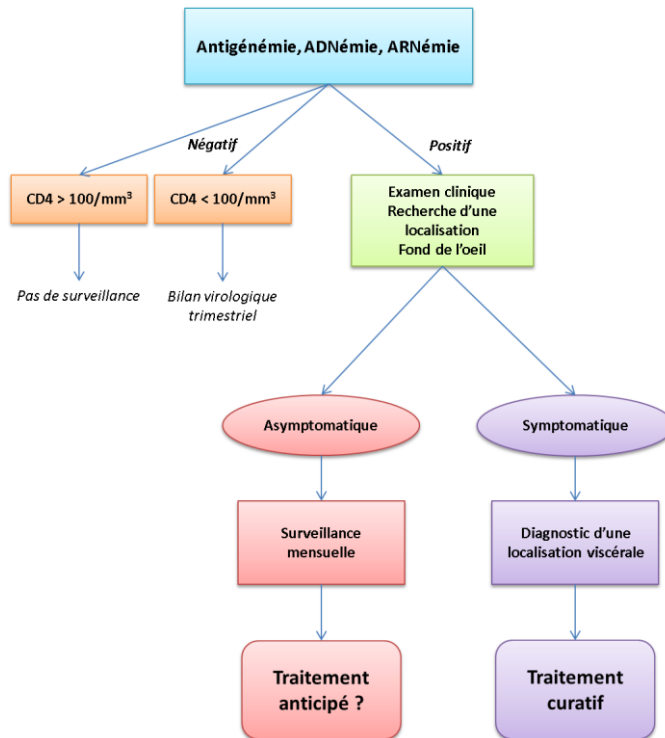


Figure 12 : Surveillance des marqueurs de l'infection à CMV au cours de l'infection VIH

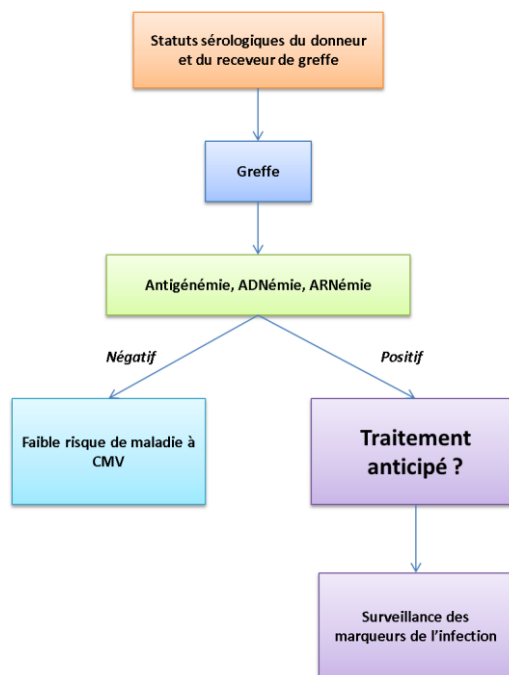


Figure 13 : Surveillance de l'infection à CMV après greffe

iii. Infection chez l'immunodéprimé

+ Infection chez le patient séropositif pour le VIH (Figure 12)

Le risque de maladie à CMV chez les patients fortement immunodéprimés peut être réduit par traitement anti-CMV anticipé, dès la détection de marqueurs virologiques d'infection active à CMV (PCR positive sur sang total). Les patients présentant un taux de lymphocytes T CD4⁺ < 100/mm³ doivent être suivis à cause du risque de rétinite à CMV (observation du fond de l'œil). La survenue de marqueurs d'infection active impose une surveillance constante dans le but d'entreprendre un traitement antiviral adéquat.

+ Infection chez le transplanté (Figure 13)

Le risque de maladie à cytomégalovirus est maximal dans les trois mois suivant la transplantation. De ce fait, la surveillance du patient est mise en place pendant cette période de façon régulière et ensuite moins soutenue passé ce délai. Le plus souvent l'antigénémie est détectée et quantifiée. Lorsque la charge virale augmente entre deux prélèvements consécutifs, le risque de développement de maladie à CMV est augmenté. La PCR leucocytaire peut également être utilisée comme technique de diagnostic de l'infection.

Chez les patients receveurs d'organes, le traitement est mis en place dès la détection de 1000 à 5000 copies de génome par ml de plasma. Chez les patients recevant une greffe de moelle osseuse, le traitement est instauré dès la détection de l'ADN viral dans le plasma sanguin.

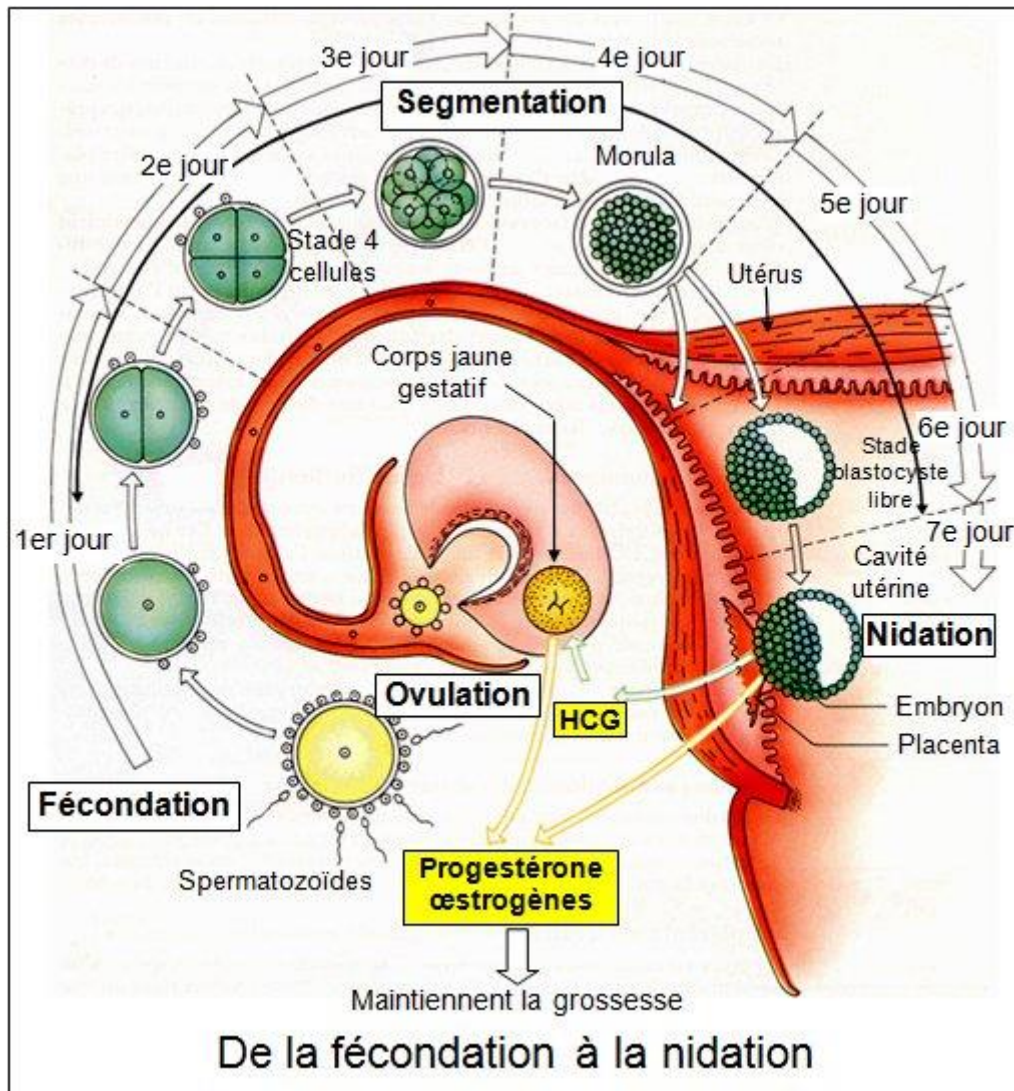


Figure 14 : Etapes de la fécondation à la nidation via les trompes utérines

(D'après http://georges.dolisi.free.fr/Transmission_vie/8_gestation.htm)

B) Placenta

I) Généralités

Le placenta est un organe transitoire indispensable au maintien de la grossesse et au développement du fœtus. Il présente de multiples fonctions : endocrines, d'échanges et immunomodulatrices. Le placenta humain, tout comme celui des primates supérieurs est caractérisé par une fonction endocrine intense, un remodelage des vaisseaux utérins ainsi qu'une invasion profonde de la paroi utérine, d'où son nom de placenta hémochorial. En effet, au début de la grossesse, le trophoblaste invagine la décidua et le myomètre. Cette invasion permet l'établissement d'un contact direct entre le trophoblaste et le sang maternel. Il est important de souligner que le bon déroulement physiologique de la placentation dépend de la vascularisation utéro-placentaire.

Le transport des gaz, des nutriments, des hormones et des anticorps maternels à travers la barrière placentaire s'opère par différents mécanismes : diffusion passive (O_2 , CO_2 , acides gras et stéroïdes), diffusion facilitée (transport du glucose), transport actif ou endocytose. Seuls les anticorps maternels IgG de la mère sont capables de traverser le placenta par transcytose et conférer une immunité au fœtus et au nouveau-né pendant les 3 à 6 premiers mois de la vie. Les IgM ne sont pas capables de traverser la barrière placentaire.

II) Placentation

a. De la fécondation à la nidation (Figure 14)

Suite à la fécondation du spermatozoïde et de l'ovule dans l'ovaire, l'œuf fécondé ou zygote subit des mitoses successives (segmentation) et rapides jusqu'à avoir un aspect de mûre, nommé morula. Au cours de ces mitoses, l'œuf fécondé se déplace le long des trompes utérines pour atteindre l'endomètre, au 6^{ème} jour post-fécondation. Cette muqueuse qui tapisse l'utérus permet l'implantation de l'œuf dès le 7^{ème} jour après la fécondation. Cette étape est nommée la nidation.

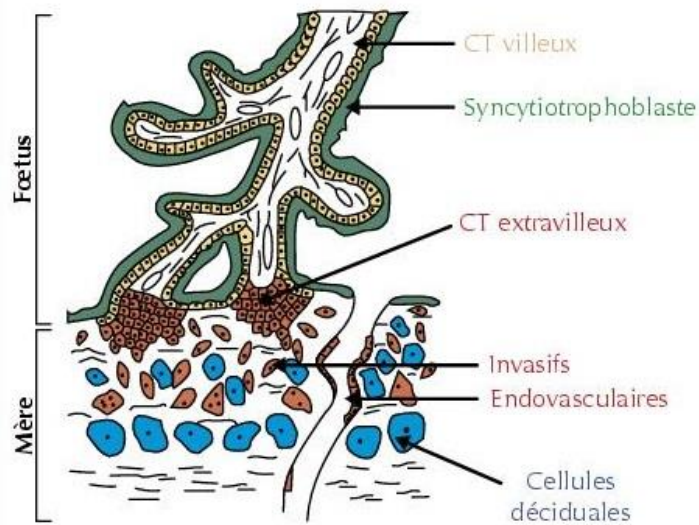


Figure 15 : Interface cellules fœtales/maternelles : Villosité crampton, lieu de migration des cytotrophoblastes extravilloux dans la décidua

(D'après Fournier et al. 2008)

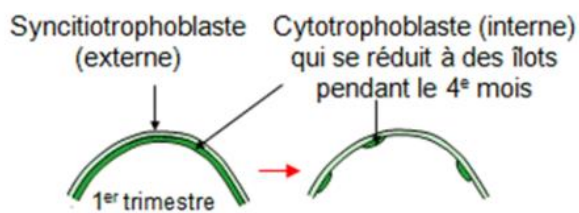


Figure 16 : Disparition des cytotrophoblastes au cours du 4^{ème} mois de grossesse

(D'après http://georges.dolisi.free.fr/Transmission_vie/8_gestation.htm)

b. Formation du blastocyste

Au 7^{ème} jour, la morula se transforme en une sphère creuse, nommé le blastocyste. Il est creusé d'une cavité, le blastocèle, limitée par de petites cellules, le trophoectoderme ou trophoblaste. Sur un pôle sont regroupées des cellules plus grosses, le bouton embryonnaire, ou embryoblaste qui est à l'origine du développement de l'individu.

c. Différenciation du trophoectoderme

Le trophoectoderme est présent dès le 5^{ème} jour du développement embryonnaire. Son premier rôle est de libérer des enzymes permettant la nidation de l'œuf dans l'endomètre. Suite à la nidation, le trophoectoderme se différencie en deux voies distinctes : les cytotrophoblastes villosités (CTV) ou couche de Langhans et les cytotrophoblastes extravillous invasifs (CTEV), reposant sur la lame basale. Les CTV sont des cellules mononucléées qui fusionnent entre elles pour former un syncytium, les syncytiotrophoblastes (ST), plurinucléés (Figure 15). Notons qu'au cours du 4^{ème} mois du développement embryonnaire, le cytotrophoblaste villosités disparaît partiellement de la paroi des villosités chorionales et évolue en îlots (Figure 16).

Les syncytiotrophoblastes sont impliqués dans les échanges de gaz et de nutriments entre la mère et le fœtus. Ils synthétisent et sécrètent des hormones stéroïdes (progestérone, oestrogènes), polypeptidiques (*Human Chorionic Gonadotropin*, HCG ; *Human Placental Lactogen*, HPL ; *Placental Growth Hormone* PGH ; leptine) ainsi que des facteurs de croissance et des cytokines. L'hormone HCG assure le maintien du corps jaune, et ainsi la production de progestérone. La nidation est réalisée grâce aux syncytiotrophoblastes qui envahissent progressivement l'endomètre en lysant ses cellules et les vaisseaux sanguins. C'est l'ébauche du placenta et des lacunes sanguines.

Les CTEV, situés à la base de la villosité crampon, prolifèrent puis deviennent invasifs et migrent dans la décidua et le myomètre. Ils colonisent les vaisseaux maternels ou se différencient en cellules géantes plurinucléées. Le tissu décidua exerce une fonction endocrine par la production de prolactine, de facteurs de croissance et joue un rôle important dans le contrôle de l'invasion de l'endomètre par le trophoblaste. La décidua intervient également dans la nutrition de l'embryon.

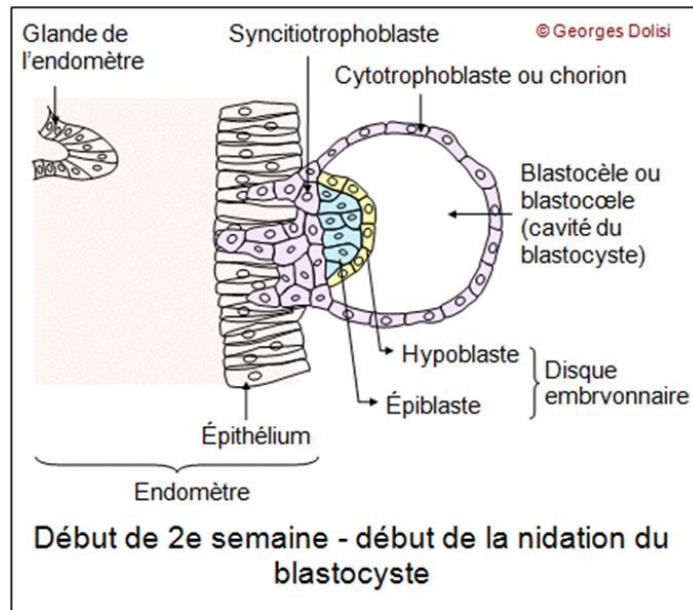


Figure 17 : Différenciation de l'embryoblaste

(D'après http://georges.dolisi.free.fr/Transmission_vie/8_gestation.htm)

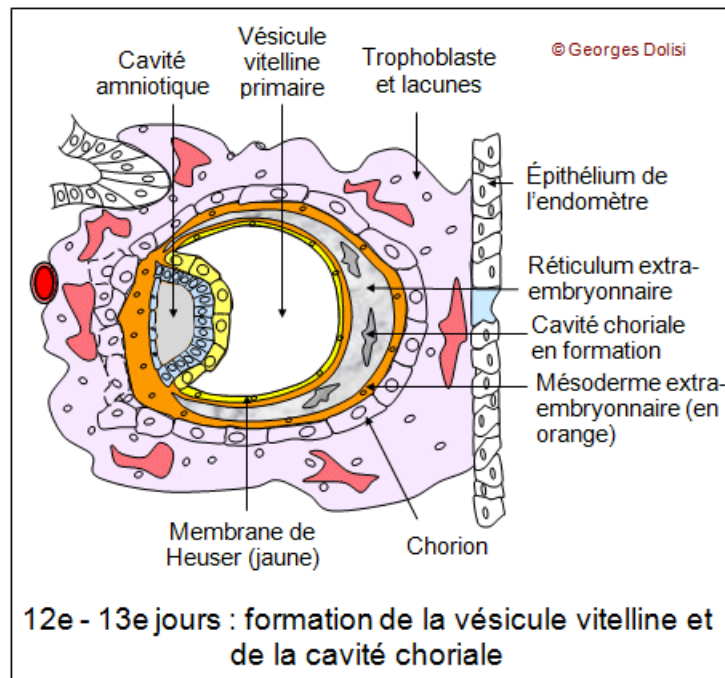


Figure 18 : Formation de la vésicule vitelline et de la cavité choriale

(D'après http://georges.dolisi.free.fr/Transmission_vie/8_gestation.htm)

L'ensemble de ces deux couches cellulaires, syncytiotrophoblastes et cytotrophoblastes extra-villeux, représente le chorion. Au 3^{ème} mois de gestation, le chorion prend alors le nom de placenta.

d. Différenciation de l'embryoblaste

Suite à la nidation, l'embryoblaste va se différencier en deux feuillets : l'épiblaste ou ectoderme primaire et l'hypoblaste ou endoderme primaire (Figure 17). L'épiblaste forme ensuite une cavité dans lequel l'amnios va s'accumuler. Cette cavité amniotique entoure complètement l'embryon dès la 8^{ème} semaine de gestation.

Les cellules de l'hypoblaste prolifèrent ensuite à la face interne du cytotrophoblaste pour former la membrane de Heuser. Celle-ci entoure progressivement le blastocèle, cavité renfermant le blastocyste. Lorsque cette membrane est complète (12/13^{ème} jour de gestation), le blastocèle devient la vésicule vitelline primaire. Un réticulum extra-embryonnaire dans lequel des lacunes vont apparaître et former la cavité choriale se forme autour de cette vésicule (Figure 18). Les cellules qui tapissent l'intérieur de la vésicule vitelline forment l'endoderme.

NB : La suite des différents stades de l'embryogenèse ne seront pas développés ici.

e. Formation des villosités placentaires

Au 14^{ème} jour de gestation, les lacunes du trophoblaste et les capillaires maternels se rapprochent. Les cellules du trophoblaste constituent progressivement les villosités trophoblastiques primaires qui baignent dans le sang maternel apporté par les artères utérines (Figure 4). Ces villosités représentent l'unité structurale et fonctionnelle du placenta. Vers le 16^{ème} jour, l'interaction entre le mésoderme extra-embryonnaire et le trophoblaste permet la constitution des villosités choriales secondaires ou placentaires.

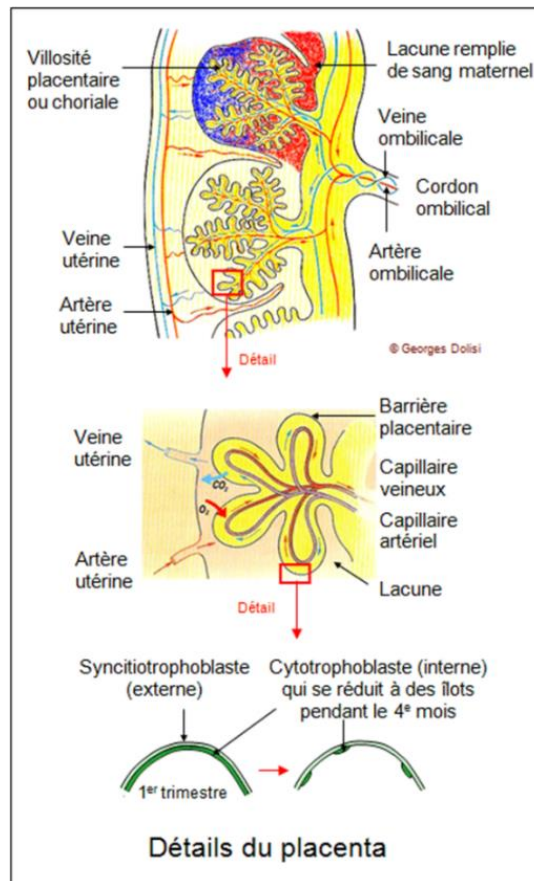
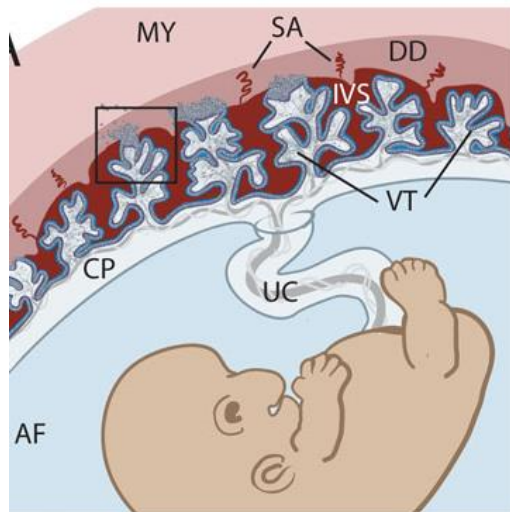


Figure 19 : Formation des capillaires fœtaux dans les villosités placentaires

(D'après http://georges.dolisi.free.fr/Transmission_vie/8_gestation.htm)



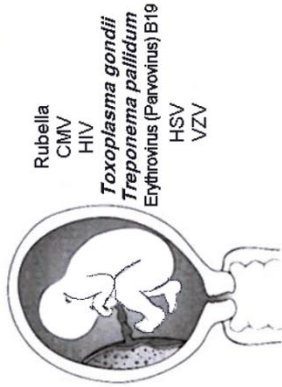
- (AF) liquide amniotique
- (UC) cordon ombilical
- (VT) villosités flottantes
- (DD) décidua
- (MY) myomètre
- (IVS) espace intervillositaires contenant le sang maternel
- (CP) plaque chorionique
- (SA) artères spirales

Figure 20: Placenta, focus sur les villosités flottantes à 6 semaines de gestation

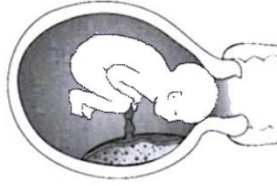
(Modifiée d'après

http://php.med.unsw.edu.au/embryology/images/9/97/Early_placental_structure.jpg)

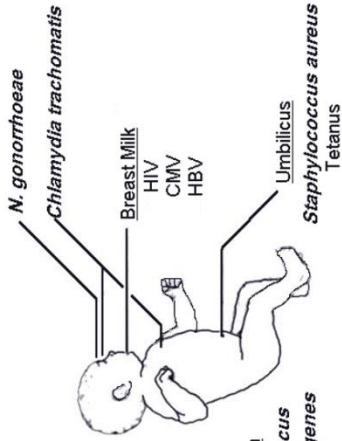
PERINATAL INFECTION
Manifestations -Meningitis -Septicemia -Pneumonia -Preterm Labor



CONGENITAL INFECTION
Manifestations -Growth Retardation- low birth weight -Congenital Malformations -Fetal Loss- Stillbirths



Neisseria gonorrhoeae
Chlamydia trachomatis
 HSV
Streptococcus agalactiae
 (Group B Strep.)
E. coli
Listeria monocytogenes
 CMV



POSTNATAL INFECTION
Manifestations -Meningitis -Septicemia -Conjunctivitis -Pneumonitis

Person to Person
 Group B *Streptococcus*
Listeria monocytogenes
E. coli

Figure 21 : Infections congénitales et périnatales
 (Modifiée d'après Remington et al. 1995)

Ensuite, un réseau de capillaires fœtaux, dans lequel circule le sang de l'embryon, se développe au niveau de l'axe du mésenchyme extra-embryonnaire et s'enfonce dans les villosités. Celles-ci deviennent alors fonctionnelles vers le 21^{ème} jour de gestation (Figure 19).

La face fœtale est alors appelée plaque chorale alors que la face maternelle est appelée plaque basale (Figure 20). Entre ces deux plaques, les villosités chorales tertiaires flottent dans la chambre intervillieuse ou lacune dans laquelle circule le sang maternel. A l'interface fœto-maternelle, au niveau du site d'implantation, l'arbre villositaire est également constitué de villosités crampons, situées à la plaque basale et ancrées dans l'endomètre.

III) Placenta et micro-organismes

Bien que le placenta soit relativement imperméable aux micro-organismes, un certain nombre d'agents pathogènes, aussi bien des virus, des bactéries que des parasites sont capables de le traverser et d'infecter le fœtus. Les anticorps maternels sont le seul système de défense immunitaire du fœtus. Ainsi une maladie bénigne pour la mère peut devenir mortelle pour le fœtus. Les agents infectieux capables d'infecter le fœtus (infection *per-placentaire* = infection congénitale) ou le nouveau-né (infection *per-partum*, c'est-à-dire infection à la naissance) *via* les échanges de sang mère/fœtus, sont notamment, un parasite : *Toxoplasma gondii*, des bactéries : *Treponema pallidum*, et *Listeria monocytogenes*, et des virus de la rubéole, de la varicelle, le parvovirus B19, le VIH et le cytomégalovirus (Figure 21). Cependant, depuis la mise en œuvre de la vaccination généralisée contre la rubéole, le CMV est devenu la première cause d'infection congénitale virale.

Dans le chapitre suivant, nous aborderons la physiopathologie de l'infection du placenta par le CMVH et les mécanismes de transmission au fœtus à travers l'étude des différents modèles d'infections congénitale et périnatale.

C) Infections congénitale et néonatale à CMV : apport des modèles dans la compréhension des mécanismes de l'infection

I) Généralités

Le manque de connaissances sur l'infection congénitale et néonatale à CMVH a conduit à l'élaboration de modèles d'études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Ces modèles aident à mieux comprendre la physiopathologie de ce virus, sa transmission au fœtus *via* le placenta notamment ; et permettent de tester l'efficacité de nouveaux traitements, des antiviraux ou des vaccins anti-CMV.

Les modèles d'infections congénitale et néonatale à CMV se sont développés à partir des années 1970 suite à la découverte de changements structuraux des cellules placentaires infectées par le CMVH *in situ*. Les modèles *in vitro* reposent sur l'étude de l'infection virale de cellules placentaires humaines ou animales telles que les cytotrophoblastes ou les syncytiotrophoblastes isolés de placentas à différents stades de gestation. L'infection congénitale est également étudiée *ex vivo* dans des explants de placentas (explants de villosités chorioniques, explants de décidua). Les modèles *in vivo* permettent l'étude de l'infection congénitale et néonatale dans différentes espèces (cochon d'Inde, macaque rhésus).

Le CMVH peut être transmis de la mère au fœtus ou au nouveau-né par différentes voies. Les voies de transmission sont différentes selon le type d'infection.

✚ **Infection congénitale, *via* le placenta**, par deux voies possibles à partir des leucocytes maternels infectés par le CMV (Altshuler and McAdams 1971; Becroft 1981) :

- à travers des micro-brèches dans la couche cellulaire de syncytiotrophoblastes
- à travers les cytotrophoblastes des villosités d'ancrage, partie placentaire maternelle.

Dans les deux cas, le virus se propagerait ensuite dans les fibroblastes du mésenchyme des villosités flottantes avant d'atteindre le fœtus *via* la veine ombilicale.

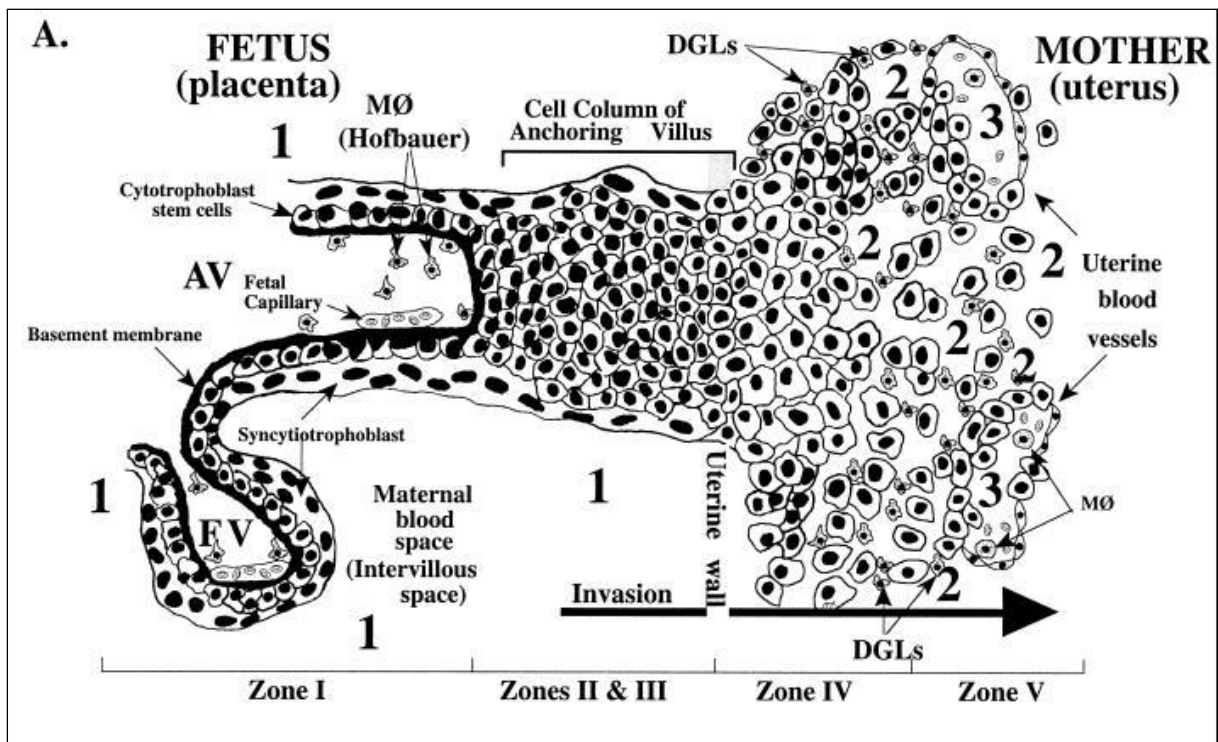


Figure 22 : Interface placentaire mère/fœtus 10 semaines post-gestation

(Fisher et al. 2000)

AV : Villosités d'encrage, FV : Villosités flottantes, MØ : Cellules de Hofbauer

DGL : leucocytes maternels de la décidua

Zone I : Espace intervillosaire, Zone II/III : utérus, Zone IV : myomètre

Zone V : vascularisation maternelle

- ✚ **Infection périnatale, via des micro-brèches dans le tractus génital** lors des contractions utérines avant l'accouchement ou lors de la délivrance par mélanges du sang maternel et fœtal
- ✚ **Infection post-natale, via l'allaitement du nouveau-né avec le lait maternel contaminé.**

II) Découverte de l'infection congénitale *in situ*

L'étude de l'infection *in situ* de placentas à terme ou de 1^{er} trimestre de grossesse a permis d'identifier les cellules cibles de la réplication virale. Les modèles *in vitro* ou *ex vivo* ont suivi cette découverte.

Dès 1970, la présence de gonflements ou inclusions cytomégaliqes dans les cellules endothéliales des capillaires fœtaux ou dans les macrophages fœtaux (cellules de Hofbauer), ou dans les fibroblastes du stroma des villosités placentaires a été observée dans des coupes de placentas à terme infectés *in utero* par le CMVH (Blanc 1978; Becroft 1981; Benirschke 1990; Sinzger et al. 1993).

En 1992, Mühlemann et ses collaborateurs ont révélé par immunohistochimie (*via* le marqueur viral *Immediate Early Antigen*), la présence du virus CMVH dans différents types cellulaires du placenta. Ils ont montré que les cellules endothéliales fœtales et les syncytiotrophoblastes des villosités flottantes sont permissifs au CMV, avec une prévalence de 1/6 (Muhlemann et al. 1992). Cette faible prévalence a été confirmée dans une autre cohorte de patientes CMV séropositives, dans laquelle seul un placenta présentait du virus dans les ST (Fisher et al. 2000) ; la majorité des cellules infectées étant les cytotrophoblastes et les fibroblastes des villosités chorioniques et d'ancrage (Muhlemann et al. 1992; Sinzger et al. 1993; Fisher et al. 2000). L'infection des CT a été montrée dans des placentas de 1^{er} trimestre de grossesse, ainsi que dans la décidua (Pereira et al. 2003) (Figure 22)

Des modèles d'étude *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, ont aidé à déterminer la ou les voies de transmission du virus *via* le placenta.

III) Infection placentaire dans des modèles *in vitro* et *ex vivo*

Les modèles d'infection placentaire à CMVH *in vitro* et *ex vivo* consistent à étudier la virulence et la permissivité de souches virales CMVH dans différents types cellulaires. *In vitro*, des cultures de trophoblastes ont été développées. La technique consiste dans un premier temps à isoler les trophoblastes de placentas à terme, puis dans un deuxième temps, de les différencier en deux voies distinctes : les cytotrophoblastes et les syncytiotrophoblastes par la présence ou l'absence du facteur Epithelial Growth Factor (EGF), respectivement. L'inoculation avec la souche humaine de référence AD169 de ces cellules différenciées conduit à une infection majoritaire des CT. Les ST positives au CMV sont rarement détectés. Ces observations sont en accord avec les analyses de placentas *in situ* (Hemmings et al. 1998). Les antigènes viraux très précoce (I.E.A), précoce (E.A) et tardif (L.A) détectés respectivement à 2, 4 et 6 jours post-infection nous renseignent sur la cinétique de réplication du virus (Halwachs-Baumann et al. 1998).

Des cultures primaires de CT isolés de villosités chorioniques de 10 à 16 semaines de gestation démontrent également leur permissivité par la présence de l'ADN viral AD169 (Fisher et al. 2000). La viabilité cellulaire, dans ce modèle, est améliorée par l'ajout d'une matrice de matrigel dans les cultures cellulaires, qui libère des facteurs de croissance. Dans ce modèle, il a été démontré d'une part que le virus est capable d'infecter les trophoblastes et d'autre part, qu'il réduit la capacité de différenciation et d'invasion des cytotrophoblastes, suggérant ainsi une corrélation entre le retard de grossesse intra-utérine et l'infection à CMVH (Fisher et al. 2000).

Ex vivo, un modèle d'explants de villosités d'ancrage de placentas de 6 à 8 semaines de grossesse a été développé. Le virus de la souche AD169 est détecté dans les CT, mais est totalement absent dans les ST (Fisher et al. 2000).

La permissivité des cellules placentaires au CMV a été étudiée avec diverses souches virales, aussi bien des souches de laboratoire que des souches cliniques isolées de patients CMV⁺. Les souches Towne, Davis et Toledo sont capables d'infecter les trophoblastes *in vitro*. En revanche, la cinétique d'infection diffère d'une souche à l'autre. En effet, la souche Davis infecte moins rapidement les cultures primaires de CT de placentas à terme que la souche Towne ou l'AD169 (Hemmings et al. 1998). La cinétique d'infection diffère également selon le type cellulaire que le virus infecte.

En effet, en clinique, les fibroblastes embryonnaires humains sont le plus souvent utilisés pour isoler et cultiver le virus en raison de sa rapidité de propagation cellulaire : l'infection débute dans les fibroblastes 2 jours post-infection (p.i) contre 5 jours p.i dans les trophoblastes (Halwachs-Baumann et al. 1998; Hemmings et al. 1998).

La souche virale Toledo, qui a l'avantage de posséder des similarités de séquences avec les souches sauvages du CMVH (Cha et al. 1996) a été testée *ex vivo* dans un modèle d'explants de villosités flottantes de placentas de 1^{er} trimestre de grossesse. Cette étude a montré que la souche Toledo se réplique dans les tissus placentaires, de manière croissante pendant 21 jours (Gabrielli et al. 2001).

Ces modèles nous permettent de conclure quant à la permissivité des cytotrophoblastes au CMVH, et plus faiblement aux syncytiotrophoblastes aussi bien des souches cliniques que de laboratoire. D'autres modèles se sont penchés sur la possibilité d'une infection de la décidua, couche cellulaire maternelle en contact direct avec le myomètre, site probable de propagation virale.

La culture d'explants de décidua isolée de placentas de 1^{er} trimestre a mis en évidence la présence de CMV 6 jours post-infection, *via* les protéines virales I.E.A, E.A et L.A (Weisblum et al. 2011). Comme les trophoblastes, ces cellules sont permissives à l'AD169, mais la charge virale mesurée dans ces cellules est d'environ 1000 fois moins importantes que dans des cultures de fibroblastes embryonnaires humains (HFF) ($1,4 \cdot 10^5$ copies dans la décidua contre $7 \cdot 10^8$ dans les HFF) (Weisblum et al. 2011).

L'ensemble de ces modèles d'infection congénitale à CMVH utilisent des placentas de différents stades de gestation. Il semblerait que le stade de différenciation des syncytiotrophoblastes ait un impact sur leur permissivité aux virus et par conséquent sur la transmission du virus aux cellules avoisinantes. Il semblerait que contrairement aux trophoblastes du 1^{er} trimestre de grossesse, les trophoblastes de placentas à terme soient peu permissibles au CMV ou que ces cellules soient permissives au virus mais que la réplication virale soit plus lente dans le placenta à terme (Hemmings et al. 1998). De façon surprenante, la fréquence de transmission du CMVH au fœtus augmente modérément au cours de la grossesse (25 à 35 % au 1^{er} trimestre, 35 à 45 % au 2^{ème} et 45 à 75 % au 3^{ème} (Revello and Gerna 2004).

L'ensemble de ces observations *in situ*, *in vitro* et *ex vivo* permettent d'affirmer que le cytomégalovirus est capable d'infecter les villosités flottantes et d'ancrage (trophoblastes, fibroblastes) ainsi que les cellules déciduales. La faible permissivité des ST pour le CMV a soulevé des questions quant à leur rôle dans la transmission du virus au fœtus. Il a été montré que ces cellules jouent un rôle clef dans l'immunité passive. En effet, les ST présentent à leur surface cellulaire, le récepteur néonatal Fc qui permet le transport des immunoglobulines (Simister et al. 1996; Firan et al. 2001). Les immunoglobulines IgG se lient avec la glycoprotéine de surface gB du CMV. Ce complexe est ensuite internalisé dans des vésicules au sein des ST (Maidji et al. 2006). Ces observations laissent supposer un rôle possible de transcytose des ST permettant le passage du virus du sang maternel aux CT fœtaux. (Pereira et al. 2005; Maidji et al. 2006). La présence de leucocytes fœtaux colocalisés avec des protéines virales dans les capillaires fœtaux du stroma des villosités confirme cette hypothèse et suggère que le CMV *via* les leucocytes maternels pourrait traverser le placenta et entrer dans la circulation sanguine fœtale, pour ensuite se répliquer chez le fœtus (McDonagh et al. 2006).

IV) Infection congénitale et néonatale dans des modèles *in vivo*

a. Cochon d'Inde

Le développement du modèle cochon d'Inde d'infection à cytomégalovirus a connu une émergence suite à la découverte d'un cytomégalovirus spécifique au cochon d'Inde : le GPCMV. Dans les années 1920, ce virus avait été identifié dans les glandes salivaires de cochons d'Inde par la présence d'inclusions intranucléaires (Jackson 1920) puis isolé en 1957 (Hartley et al. 1957). L'infection congénitale à GPCMV *in utero* chez le cochon d'Inde a été décrite pour la première fois en 1936 suite à la détection du virus chez les fœtus (Markham and Hudson 1936). Le GPCMV a été isolé plus tard chez le nouveau-né dans la rate, les glandes salivaires, le foie, les poumons, les reins, le cerveau, le sang (Griffith and Hsiung 1980; Griffith et al. 1982; Harrison and Myers 1990) ainsi que dans le placenta (Choi et al. 1978; Griffith and Hsiung 1980; Goff et al. 1987; Griffith et al. 1990b; Griffith et al. 1990a).

Temps de l'infection chez les femelles gestantes	1 ^{er} trimestre	2 ^{ème} trimestre	3 ^{ème} trimestre
GPCMV dans placenta	78 %	100 %	89 %
GPCMV chez fœtus et nouveau-nés	22 %	25 %	20 %

Tableau 9 : Infection congénitale et néonatale chez le cochon d'Inde

(Modifié d'après Griffith et al. 1986)

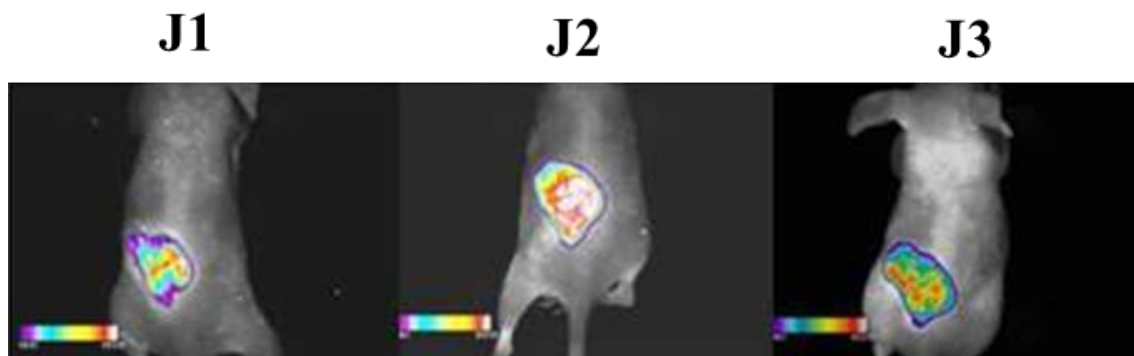


Figure 23 : Détection par imagerie du MCMV-GFP administré en sous-cutané à J1, J2 et J3 post-infection chez la souris

(Modifiée d'après Yamada et al. 2010)

Dans les années 80, l'infection placentaire a été observée dans un modèle de cochon d'Inde infecté par la souche virale GPCMV. La technique de microscopie électronique a permis de détecter chez ces animaux, des nucléocapsides virales dans les ST des villosités flottantes, 28 jours post-infection (Griffith et al. 1985). Suite à ces observations, des modèles d'infection congénitale ont été développés chez le cochon d'Inde. Cet animal a l'avantage de présenter des pathologies à CMV chez le « nouveau-né cochon d'Inde » similaires à celles de l'homme, et notamment des déficits neurosensoriels ou des otites internes (Woolf et al. 1989; Woolf 1990).

En clinique, la détection du virus chez le fœtus et chez le nouveau-né a montré que le placenta avait un rôle clef dans la transmission du virus, mais aussi qu'il pouvait agir comme une barrière. Il en est de même chez le cochon d'Inde puisque 40 à 80 % des femelles gestantes transmettent leur virus au fœtus (Choi et al. 1978; Bia et al. 1983). La date de la primo-infection au cours de la grossesse ne semble pas avoir d'incidence sur la transmission du virus au fœtus. En effet, les femelles gestantes infectées au 1^{er}, au 2^{ème} ou au 3^{ème} stade de gestation, ont une prévalence de transmission de 22, 25 et 20 % respectivement (Griffith et al. 1986) (Tableau 9). En revanche, la date de la primo-infection au cours de la gestation semble avoir une incidence sur la mortalité fœtale. L'inoculation tardive de GPCMV au cours de la 2^{ème} ou 3^{ème} partie de gestation peut conduire à la mort fœtale *in utero* (Harrison and Myers 1990; Bratcher et al. 1995). Il est important de souligner que les conséquences pathologiques de l'infection congénitale à CMV chez le fœtus et le nouveau-né dépendent de la virulence du GPCMV (Bia et al. 1980; Harrison et al. 1995).

Depuis peu, l'étude de la propagation virale au cours du temps est réalisable chez le rongeur grâce à une nouvelle technologie (Yamada et al. 2010) (Figure 23). Cette technique consiste à détecter par bioluminescence, un virus recombinant marqué à la luciférase dans l'organisme de l'animal.

Le virus GPCMV a été ainsi tracé chez les femelles en gestation. L'injection intrapéritonéale du virus recombinant a conduit à sa propagation chez la femelle, de la rate, au foie jusqu'aux poumons. L'infection congénitale a été démontrée 7 jours post-infection, par la détection de bioluminescence dans le cerveau des fœtus (McGregor and Choi 2011). Cette technologie pourrait être également utilisée comme outil thérapeutique pour déterminer en temps réel, l'efficacité de nouvelles molécules anti-CMV *in vivo*.

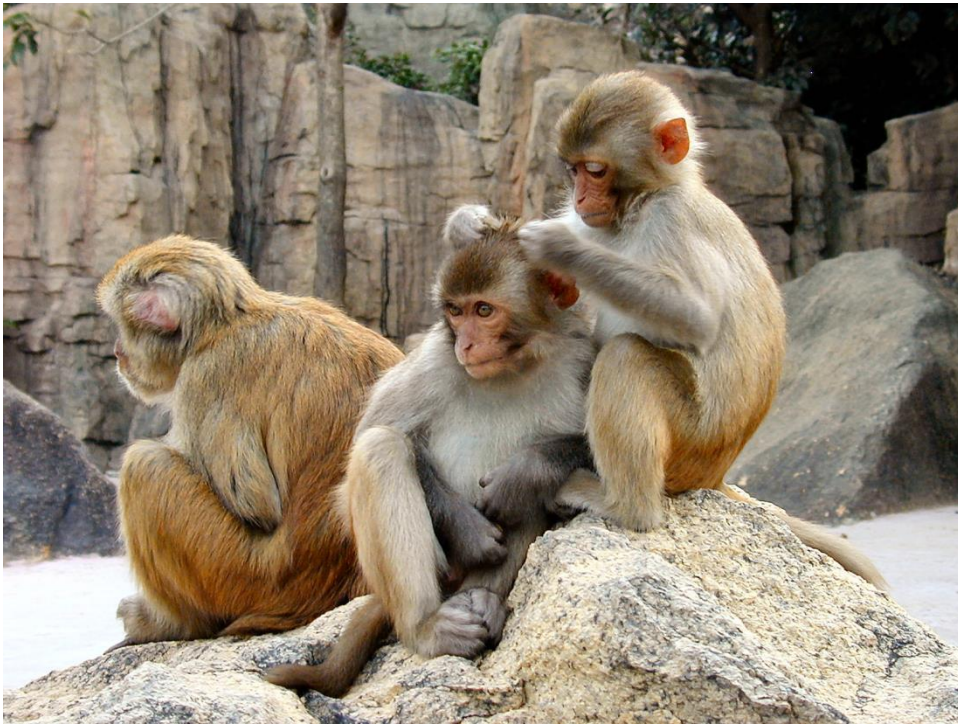


Figure 24 : Macaca mulatta ou macaque rhésus

b. Macaque rhésus (Figure 24)

Le cytomégalovirus RhCMV spécifique du macaque rhésus, *Macaca mulatta*, a été identifié en 1929 au sein de plusieurs organes. L'infection virale se caractérise par la présence d'inclusions intranucléaires dans les cellules de la muqueuse nasale des macaques (Stewart and Rhoads 1929), dans les reins (Hindle 1929) et dans les cellules épithéliales de la trachée, des poumons et du conduit biliaire (Covell 1932). En 1974, le RhCMV sera finalement isolé de l'urine des macaques rhésus adultes et classifié comme cytomégalovirus en raison de son effet cytopathique cytomégaly (Asher et al. 1974). Le système immunitaire activé suite à l'infection RhCMV, réduit la pathogénèse mais n'élimine pas les réservoirs d'expression des gènes viraux (Lockridge et al. 1999). Ce virus, tout comme le CMV humain est endémique, et est responsable d'infections asymptomatiques. En effet, les singes immunocompétents ne présentent pas pour la majorité des cas, de signes cliniques de maladie après inoculation naturelle ou expérimentale (Vogel et al. 1994; Lockridge et al. 1999). La séroprévalence étant d'environ 95 % chez les macaques âgés d'un an, les fœtus semblent être protégés lors d'infections congénitales en raison de l'immunité anti-RhCMV acquise par la mère (Vogel et al. 1994; Andrade et al. 2003). En revanche, le RhCMV peut conduire à la morbidité des macaques expérimentalement infectés (London et al. 1986; Tarantal et al. 1998; Chang et al. 2002). La primo-infection expérimentale au cours de la gestation est responsable de sévères pathologies du système nerveux central et sensoriel chez le fœtus macaque. Ces anomalies développementales sont semblables à celles de l'homme : microcéphalie, calcifications périventriculaires ou ventriculomégalies (Barry et al. 2006; Dollard et al. 2007).

Le *Macaca mulatta* est un bon modèle d'infection à CMV. Ce modèle animal est celui qui se rapproche le plus de l'homme d'un point de vue développemental (structure du placenta, développement des organes), immunologique, anatomique et biochimique (Barry et al. 2006). A ce jour, les voies de transmission du RhCMV n'ont pas été caractérisées. Il est sans doute transmis horizontalement tout comme le CMVH *via* les sécrétions corporelles telles que le lait, la salive, l'urine et les sécrétions génitales (Asher et al. 1974; Huff et al. 2003). La transmission verticale naturelle de ce virus n'a jamais été mise en évidence.

Le premier modèle d'infection congénitale à CMV chez le *Macaca mulatta* a été développé en 1986. L'inoculation intra-amniotique de 10^5 RhCMV à J50 post-fécondation conduit à l'infection de 16/20 fœtus macaques (London et al. 1986). Les fœtus CMV⁺ présentent des anomalies du système nerveux (dilatations ventriculaires (30 %), gliose (80 %), calcifications...) et du placenta (81 %). Ces anomalies anatomiques et physiologiques sont également observées chez des fœtus suite à l'administration de RhCMV chez les femelles gestantes par voie intrapéritonéale à J60 post-gestation (Tarantal et al. 1998) ou par voie intracrânienne à J50 post-gestation (Chang et al. 2002).

Ce modèle a permis d'observer l'infection congénitale et l'infection néonatale, mais les études réalisées ne se sont pas penchées sur la détection du virus dans les différents types cellulaires du placenta, notamment les ST et les CT.

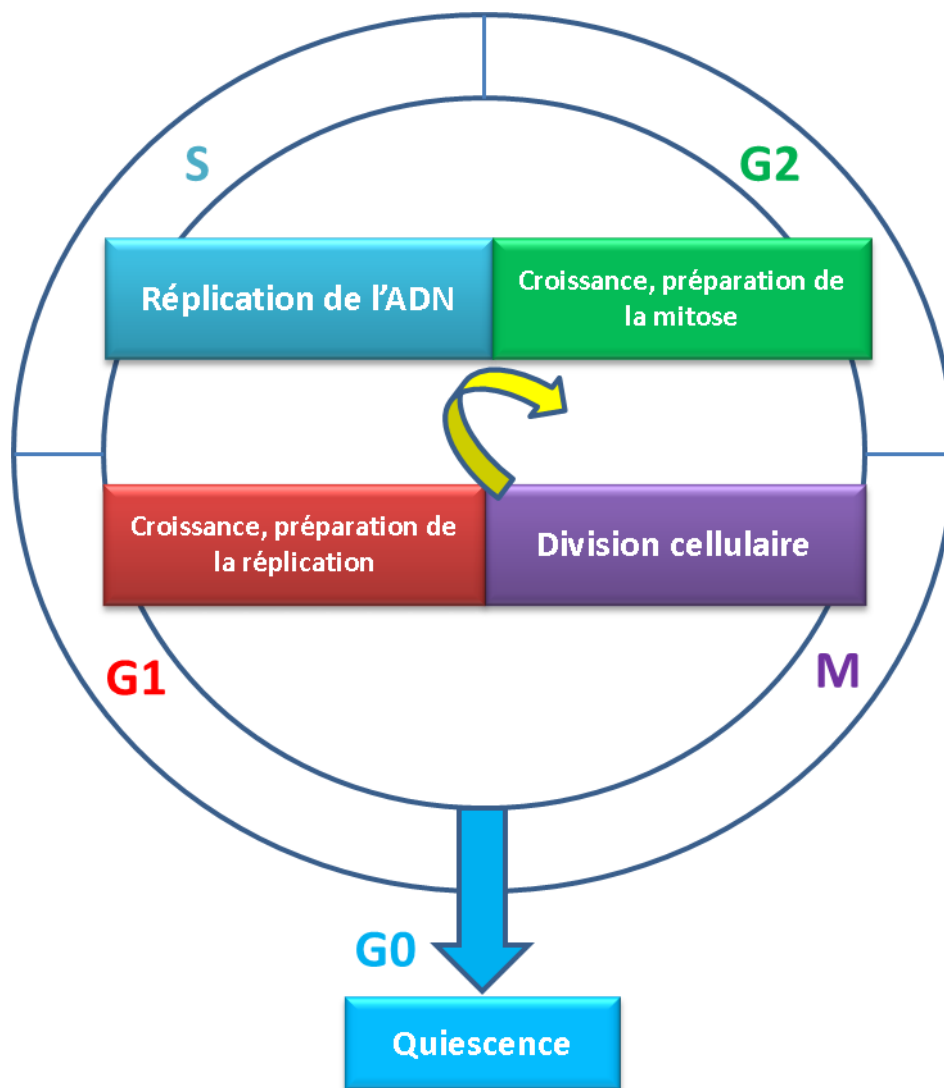


Figure 25 : Etapes du cycle cellulaire

D) Thérapeutique anti-cytomégalovirus

I) Cycle cellulaire

Les traitements anti-cytomégalovirus présentés dans ce manuscrit interviennent dans différentes étapes du cycle cellulaire de la cellule hôte infectée et du cycle viral. Afin de bien comprendre les mécanismes physiologiques de chacune des molécules, une partie sur le cycle cellulaire est développée.

a. Etapes du cycle cellulaire (Figure 25)

Le cycle cellulaire est un processus fondamental dans lequel une cellule mère donne naissance à deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Le cycle cellulaire est essentiellement divisé en deux temps, l'interphase (I), au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués, et la mitose (M), au cours de laquelle les chromosomes se répartissent équitablement dans les deux cellules filles. Les deux autres phases du cycle, G1 et G2, représentent des intervalles : au cours de la phase G1, la cellule effectue sa croissance, intègre les signaux mitogènes ou anti-mitogènes et se prépare pour effectuer correctement la phase S, correspondant à la réplication de l'ADN ; au cours de la phase G2, la cellule se prépare pour la phase M. Lorsque les cellules cessent toute prolifération, sous l'effet de signaux anti-mitogènes ou suite à la disparition des agents mitogènes, elles quittent le cycle cellulaire et deviennent quiescentes.

b. Cycle cellulaire et complexe Cdks/Cyclines

Le mécanisme de division cellulaire est extrêmement complexe et régulé par un grand nombre de protéines intervenant très transitoirement et dans un ordre précis, permettant ainsi la succession précise des différentes étapes du cycle cellulaire.

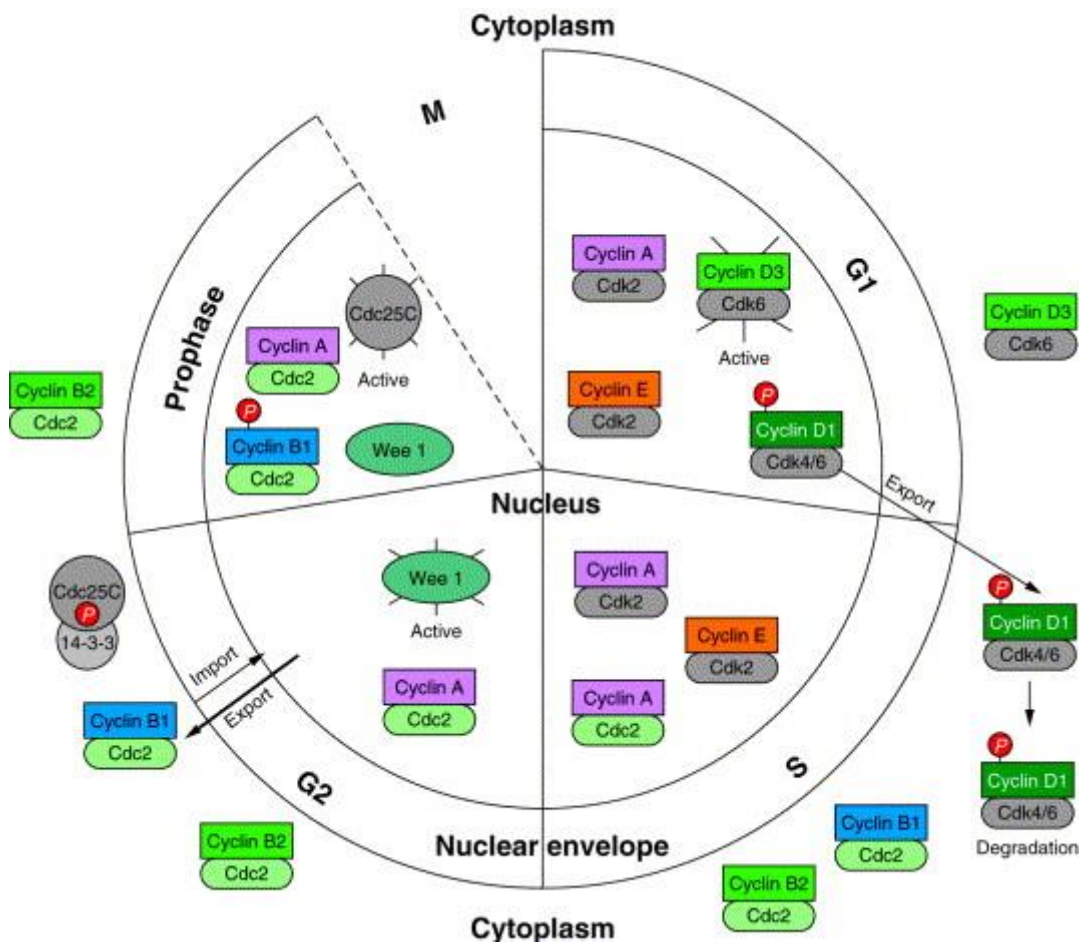


Figure 26 : Complexes Cdks/Cyclines au cours du cycle cellulaire

Les protéines kinases cycline-dépendantes (Cdks) sont à l'origine des phosphorylations requises pour l'activation des protéines responsables de l'exécution de l'avancée dans le cycle ; mais le rôle des phosphatases, des systèmes de protéolyse, des translocations nucléaires est également primordial. À chaque phase du cycle cellulaire correspond un ou plusieurs complexes Cdks/Cyclines.

Les Cdks peuvent être divisées en deux groupes fonctionnels : les Cdks associées au cycle cellulaire et les Cdks impliquées dans la régulation transcriptionnelle.

i. Structure des Cdks

Une protéine Cdk est constituée de deux lobes : le lobe N, essentiellement constitué de feuillets β et le lobe C, essentiellement constitué d'hélices α . À l'intersection des deux lobes se trouve un site catalytique où se produit la phosphorylation qui active les protéines jouant un rôle dans le cycle cellulaire (fragmentation de l'enveloppe nucléaire, compaction des chromosomes, réplication de l'ADN, etc.). Le site catalytique comprend deux poches juxtaposées : l'une pour accueillir la protéine à phosphoryler, l'autre pour recevoir l'ATP.

ii. Complexes Cdks/Cyclines au cours du cycle cellulaire (Figure 26)

Au cours du cycle cellulaire, les Cdk4 et 6, associées à des cyclines de type D, régulent le déroulement de la phase G1. Puis le complexe Cdk2/cycline E prend le relais pour assurer la transition G1/S, suivie par le complexe Cdk2/cycline A qui assure le contrôle de la phase S. Le complexe Cdk1/cycline A intervient en G2, et le complexe Cdk1/cycline B régule la transition G2/M et l'entrée en mitose.

Espèces	Souche virale CMV	Type cellulaire	Traitements	CI50 (µM)	Références		
Cochon Inde	GPCMV 22122	GPL	BAY 38-4766	0,5	Schleiss et al., 2005		
		GPE	GCV	61 à 217	Freitas et al., 1985, Yang et al., 1989, Rybak et al., 1999		
		GPE	Aciclovir	700 +/- 230	Freitas et al., 1985		
		GPE	2'-Nor-cGMP	3	Yang et al., 1989		
		GPE	QYL-769	7,7 +/- 0,74	Rybak et al., 1999		
		GPE	Synguanol	54,5 +/- 0,86	Rybak et al., 1999		
Macaque Rhésus	RhCMV 68-1	MRC5	GCV	8 +/- 2	Freitas et al., 1985		
		MRC5	TCRB	0,9 +/- 0,06	North et al., 2004		
		MRC5	Aciclovir	39 +/- 14	Freitas et al., 1985		
		MRC5	UMJD697	0,04 +/- 0,01	North et al., 2004		
		GPL	GCV	0,8	Swanson et al., 1998		
		GPL	Aciclovir	15	Swanson et al., 1998		
		GPL	Foscarnet	250	Swanson et al., 1998		
		HET	Aciclovir	40 +/- 15	Freitas et al., 1985		
		HET	GCV	7 +/- 2	Freitas et al., 1985		
		HFF	GCV	23,9 +/- 10,6	Rybak et al., 1999		
		HFF	QYL-769	2,2	Rybak et al., 1999		
		HFF	Synguanol	11,6 +/- 0,02	Rybak et al., 1999		
		Rat	RCMV Prescott	REF	CDV	0,1	Stals et al., 1991
				REF	QYL-769	10,7	Rybak et al., 1999
REF	Synguanol			0,037	Rybak et al., 1999		
REF	GCV			4,7 +/- 3	Rybak et al., 1999		
MRC5	GCV			25	Stals et al., 1991		
Souris	MCMV			MEF	GCV	2 à 5,7	Rybak et al., 1999, 2000, Kern et al., 2005
		Smith	MEF	Synguanol	0,3	Rybak et al., 2000	
	MEF		QYL-769	0,37	Rybak et al., 1999		
	MEF		Aciclovir	1 +/- 0,8	Freitas et al., 1985		
	MEF		Synadenol	2,1	Rybak et al., 1999		
	MEF		Synguanol	0,3	Rybak et al., 1999		
	MEF		QYL-972	0,24	Rybak et al., 1999		
	MEF		QYL-941	0,4	Kern et al., 2005		
	MEF		ZSM-I-32F	10	Kern et al., 2005		
	MEF		ZSM-I-58	54	Kern et al., 2005		
	MEF		ZSM-I-62	0,3	Kern et al., 2005		
	MEF		ZSM-I-64	42	Kern et al., 2005		
	MEF		ZSM-I-158	2			

Tableau 10 : Ensemble des CI₅₀ déterminées en culture par essais antiviraux

Espèces	Souche virale CMV	Type cellulaire	Traitements	CI50 (µM)	Références	
Humaine	AD169	HFF	GCV	2,3 à 3,6	Beadle et al., 2002, Rybak et al., 2000, Kern et al., 2005	
		HFF	CDV	0,38	Beadle et al., 2002	
		HFF	cCDV	0,31 +/- 0,02	Beadle et al., 2002	
		HFF	CMX001	0,0009 +/- 0,0001	Beadle et al., 2002	
		HFF	Synguanol	1,2	Rybak et al., 2000	
		HFF	QYL-769	2,4	Rybak et al., 2000	
		HFF	Synadenol	1,3	Rybak et al., 1999	
		HFF	QYL-972	4,5	Rybak et al., 1999	
		HFF	QYL-941	5,3	Rybak et al., 1999	
		HFF	ZSM-I-32F	12	Kern et al., 2005	
		HFF	ZSM-I-58	14	Kern et al., 2005	
		HFF	ZSM-I-62	1,2 +/- 0,8	Kern et al., 2005	
		HFF	ZSM-I-64	123	Kern et al., 2005	
		HFF	ZSM-I-158	2,7	Kern et al., 2005	
		HFF	ZSM-I-89F	>420	Kern et al., 2005	
		HFF	ZSM-I-287S	3,3	Kern et al., 2005	
		HFF	Artésunate	3,7	Kaptein et al., 2006	
		HFF	Artésunate	5,8	Efferth et al., 2002	
			AD169-GFP			
		AD169	MRC5	GCV	1,1 à 7	Biron et al., 2002, Stals et al., 1991, Lischka et al., 2010, Freitas et al., 1985
MRC5			CDV	0,6	Stals et al., 1991	
MRC5			BDCRB	0,31 +/- 0,06	Biron et al., 2002	
MRC5			AIC246	0,005 +/- 0,001	Stals et al., 1991	
MRC5			MBV	0,54 +/- 0,05	Biron et al., 2002	
MRC5			Aciclovir	95 +/- 10	Freitas et al., 1985	
HET			GCV	7 +/- 2	Freitas et al., 1985	
HET			Aciclovir	55 +/- 10	Freitas et al., 1985	
AD169			U373	GCV	1,17	Schnepf et al., 2010
			U373	Artésunate	2,22	Schnepf et al., 2010

Tableau 10 : Ensemble des CI₅₀ déterminées en culture par essais antiviraux

(MRC5) Human Embryonic Lung Fibroblasts, (HET) Human Embryonic Tonsil, Fibroblasts, (HFF) Human Foreskin Fibroblasts, (U373) Lignée d'astrocytes

Synadenol (QYL-284A), Synguanol (QYL-438), 2-amino-6-cyclopropylamino analogue (QYL-769), prodrogue du 2-amino-6-methoxypurine analogue QYL-972), 2-amino-6-methoxypurine analogue (QYL-941).

Espèces	Souche virale CMV	Type cellulaire	Traitements	CI50 (µM)	Références
Humaine	Toledo	HFF	Synguanol	8,6 +/- 3	Rybak et al., 2000
		HFF	QYL-769	5,5 +/- 1,3	Rybak et al., 2000
		HFF	GCV	9,8 à 19,6	Rybak et al., 2000, Beadle et al., 2002
		HFF	CDV	13,8 +/- 7,3	Beadle et al., 2002
		HFF	CMX001	0,025 +/- 0,007	Beadle et al., 2002
		HFF	cCDV	17,1 +/- 8	Beadle et al., 2002
	Towne	HFF	GCV	4,3 à 5,1	Beadle et al., 2002, Rybak et al., 2000
		HFF	CDV	0,4 +/- 0,11	Beadle et al., 2002
		HFF	CMX001	0,0009	Beadle et al., 2002
		HFF	cCDV	0,48 +/- 0,2	Beadle et al., 2002
		HFF	Synguanol	11,6	Rybak et al., 2000
		HFF	QYL-769	10,2	Rybak et al., 2000
		MRC5	Artésunate	1	Efferth et al., 2002
		MRC5	TCRB	2,5	North et al., 2004
		Davis	HFF	CDV	0,66 +/- 0,3
	HFF		CMX001	0,00095 +/- 0,00007	Beadle et al., 2002
	HFF		cCDV	0,45 +/- 0,07	Beadle et al., 2002
	HFF		Synguanol	2,5 +/- 0,09	Rybak et al., 2000
	HFF		QYL-769	2,2 +/- 0,62	
	MRC5		GCV	2,7 +/- 0,7	Lischka et al., 2010
	MRC5		AIC246	0,004 +/- 0,001	Lischka et al., 2010
MRC5	UMJD697		0,37	North et al., 2004	

Tableau 10 : Ensemble des CI₅₀ déterminées en culture par essais antiviraux

(MRC5) Human Embryonic Lung Fibroblasts, (HFF) Human Foreskin Fibroblasts

Synadenol (QYL-284A), Synguanol (QYL-438), 2-amino-6-cyclopropylamino analogue (QYL-769), prodrogue du 2-amino-6-méthoxypurine analogue QYL-972), 2-amino-6-méthoxypurine analogue (QYL-941).

iii. Cdks régulant la transcription des gènes

Le facteur de transcription de l'élongation P-TEFb est constitué d'une Cdk9 et d'une cycline T1. Ce complexe est un régulateur important de la transcription. Il phosphoryle le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II, conduisant à l'élongation de la transcription.

c. Cytomégalovirus et Cdks

La réplication du CMVH est dépendante de la régulation du cycle cellulaire et de l'activité des Cdks. Quatre Cdks ont un rôle important dans la réplication du virus : les Cdk 1, 2, 7 et 9.

Le CMV induit l'arrêt du cycle cellulaire, tout en maintenant un état métabolique cellulaire actif, prenant en charge la réplication virale (Albrecht et al. 1991; Boldogh et al. 1991). Le blocage de la réplication de l'ADN cellulaire résulte d'un manque d'origine de réplication de l'ADN (Biswas et al. 2003; Wiebusch et al. 2003), mais les protéines impliquées dans la production de nucléotides sont induites (Isom 1979; Lembo et al. 1999).

Les cellules infectées sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire. Les conséquences de cet arrêt sont : une augmentation du niveau d'ARNm des cyclines E (Bresnahan et al. 1996; Dittmer and Mocarski 1997), une accumulation du complexe Cdk1/Cycline B1 (Salvant et al. 1998; Sanchez et al. 2003), une hyperphosphorylation de la protéine Rb ainsi que la séquestration de p53 (Jault et al. 1995). En revanche, lors de l'infection à CMV, la cycline D de la phase G1 et la cycline A de la phase S sont inhibées (Bresnahan et al. 1996). Ces événements régulateurs créent un environnement favorable à la transcription virale, à la réplication du génome ainsi qu'à l'assemblage des particules virales (Albrecht et al. 1991; Boldogh et al. 1991).

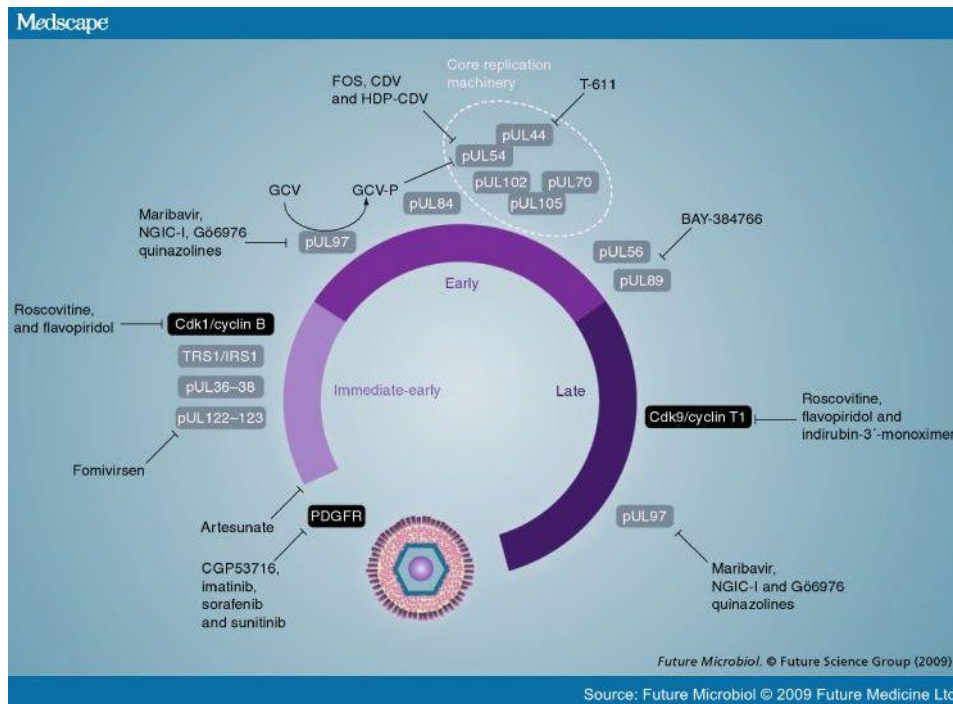


Figure 27 : Traitements anti-CMVH ciblant différents stades du cycle de réplication virale et du cycle cellulaire

(D'après Marshall et al. 2009)

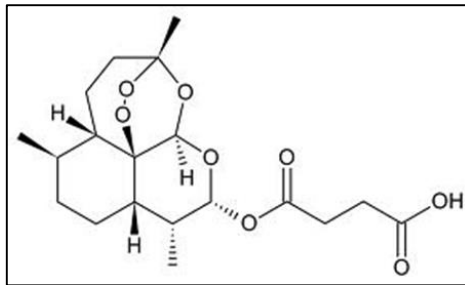


Figure 28 : Structure chimique de l'artésunate

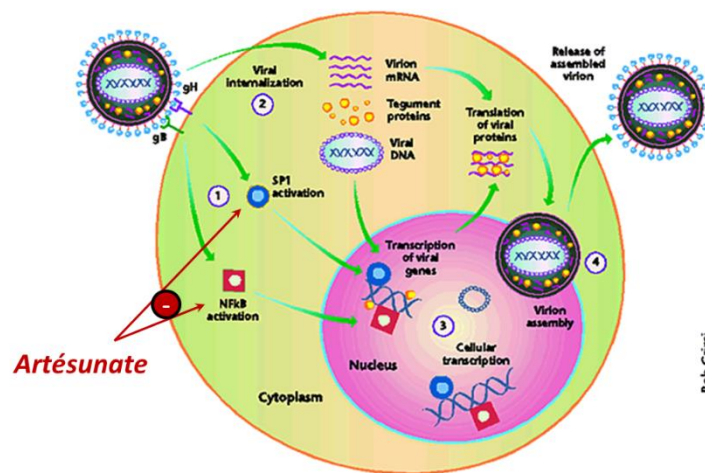


Figure 29 : Effet inhibiteur de l'artésunate sur le cycle de réplication du CMVH

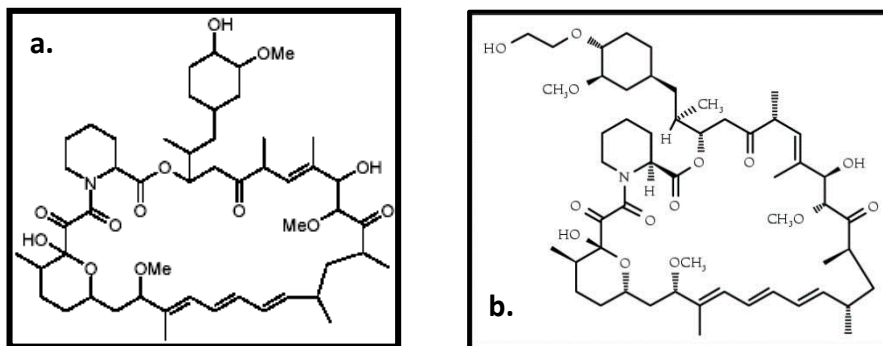


Figure 30 : Structure chimique du Sirolimus (a), de l'Everolimus (b)

II) Antiviraux au cours du cycle cellulaire et viral

L'ensemble des CI_{50} des différentes molécules ci-dessous, déterminées *in vitro*, est répertoriée (Tableau 10) en fonction des souches virales et du type cellulaire utilisés. La plupart des cibles des traitements antiviraux cités ci-dessous est répertoriée sur un schéma (Figure 27).

a. Antiviraux phase très précoce

i. Artésunate (Figure 28)

L'**artésunate**, traitement de référence des accès palustres, possède une activité antivirale contre les virus de l'hépatite B, de l'hépatite C et du SIDA. L'artésunate est actif contre les souches CMVH sauvages et les souches résistantes au GCV *in vitro* (Kaptein et al. 2006; Efferth et al. 2008) (Li et al. 2008), mais est inefficace contre les souches résistantes au valaciclovir (Lau et al.).

L'artésunate intervient dans les cascades de signalisation de la cellule, en inhibant les voies SYK/PLC γ , PI3K/Akt et NF- κ B (Cheng et al.; Thanaketpaisarn et al.; Xu et al. 2007) (Figure 29). Cette inhibition conduit à une réduction de la réplication du CMV. L'effet inhibiteur de l'artésunate peut être amélioré par l'addition de GCV, de CDV ou de PFA (Kaptein et al. 2006).

Cette molécule a montré une efficacité anti-CMVH variable chez des patients transplantés de moelle osseuse (43 à 90 % d'efficacité) (Wolf et al. 2011). L'efficacité de cette molécule pourrait dépendre de la dynamique de croissance de chaque souche virale.

ii. Sirolimus et évérolimus

Le **sirolimus** ou **rapamycine** et son dérivé l'**évérolimus** sont des immunosuppresseurs (Figure 30). Ils inhibent la voie de signalisation mTOR, ce qui conduit à réduire l'incidence de l'infection CMVH chez les patients transplantés d'organes (Vigano et al.; Hill et al. 2007; Demopoulos et al. 2008) ou de moelles osseuses (Marty et al. 2007).

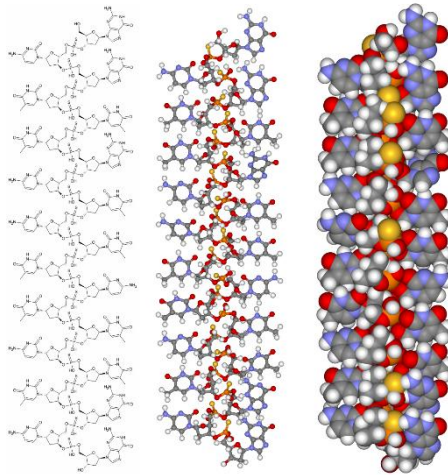


Figure 31 : Structure chimique du Fomivirsen

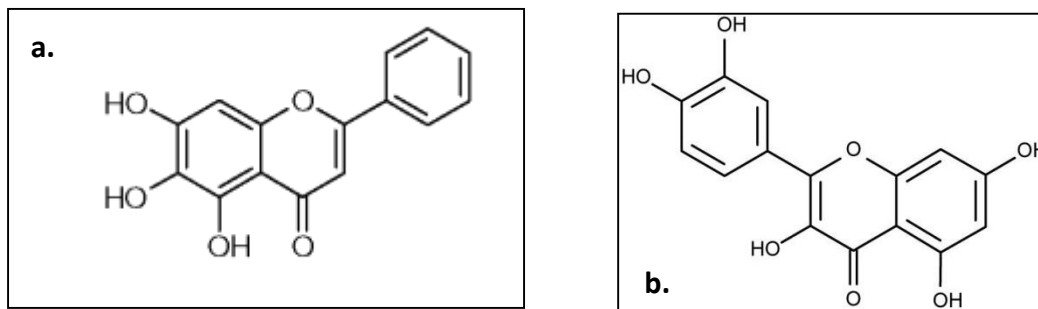


Figure 32 : Structure chimique de la Baïcaléine (a) & de la Quercétine (b)

Le sirolimus réduit la charge virale chez les patients porteurs de souches CMVH résistantes au GCV (Ozaki et al. 2007).

iii. **Fomivirsén**

Le **fomivirsén** est un ARN interférence (Figure 31). Il inhibe la synthèse des protéines virales I.E par la complémentarité de sa séquence nucléotidique à l'ARNm viral.

Administré par voie oculaire, le fomivirsén est utilisé pour le traitement local des rétinites à CMV chez les patients sidéens. L'effet indésirable le plus courant est une inflammation oculaire (Biron 2006).

iv. **Flavonoïdes : Quercétine et Baïcaléine**

La **quercétine** ou **3,3',4',5,7-pentahydroxy-2-phénylchromén-4-one** et la **baïcaléine** ou **5,6,7-trihydroxy-2-phényl-chromèn-4-one** sont des substances polyphénoliques appartenant à la famille des flavonoïdes (Figure 32). Environ 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les années 70-80 (Harborne 1986, 1988). Ces molécules sont présentes dans les : fruits, légumes, noix, graines, herbes, épices, tiges et fleurs. Ces molécules possèdent des activités antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anti-allergisantes ou antivirales.

La quercétine et la baïcaléine réduisent l'infection virale du virus de l'encéphalite japonaise (JEV) (Johari et al. 2012).

Ces deux drogues diminuent l'infection à CMVH (Evers et al. 2005) et sont capables d'inhiber l'expression des gènes très précoces (*I.E*) du CMV (Cotin et al. 2012).

La quercétine et la baïcaléine, comme l'artésunate interviennent dans l'inhibition de la voie de signalisation cellulaire NFκB, conduisant à l'apoptose des cellules infectées par le CMVH. La quercétine inhibe la kinase PI3K (phosphoinositide 3 kinase) en se liant au site d'ATP (Walker et al. 2000) et dégrade les protéines IκB, conduisant à la réduction de l'activité du facteur de transcription NFκB. De la même manière, la baïcaléine inhibe la phosphorylation des protéines IκB-α, ce qui induit une sous régulation de NFκB (Chuang et al. 2010).

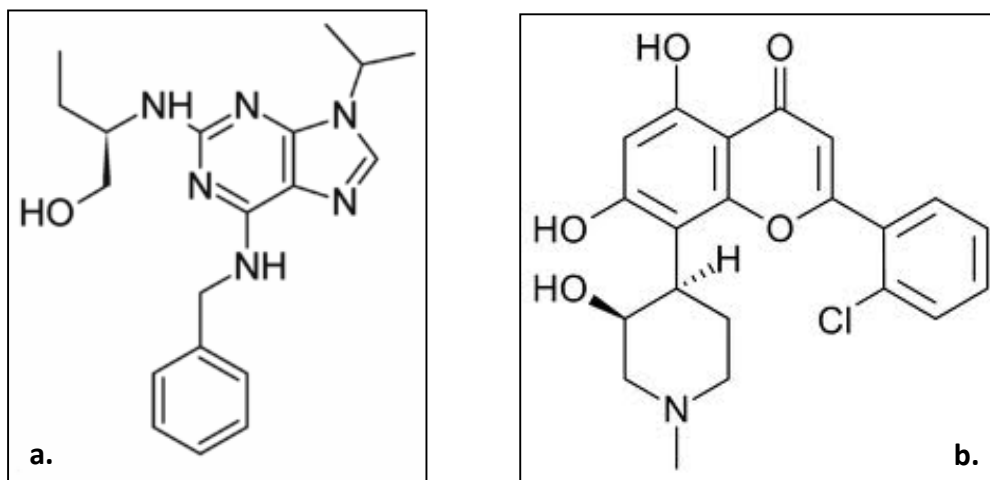


Figure 33 : Structure chimique de la Roscovitine (a) & du Flavopiridol (b)

v. Inhibiteurs des Cdks : Roscovitine et Flavopiridol

La **roscovitine** et le **flavopiridol** sont des inhibiteurs ATP-compétitifs des complexes Cdks/cyclines (Figure 33). La roscovitine inhibe l'activité des Cdks 1, 2, 5, 7 et 9 ; le flavopiridol inhibe les Cdks 1, 2, 4 et 9.

L'inhibition des complexes Cdks/cyclines conduit à la diminution de la synthèse de l'ADN viral du CMVH, l'expression des gènes tardifs (L) et la production de virus infectieux (Bresnahan et al. 1997). La roscovitine induit une agrégation de la protéine pUL69 dans le noyau de la cellule hôte infectée (Rechter et al. 2009), protéine permettant l'export des ARNm hors du noyau cellulaire. Cette molécule a montré un effet antiviral contre de nombreux virus : des herpès virus (VZV, HSV1), des papillomavirus, des polyomavirus ou encore le VIH de type 1 (Schang et al. 2006).

b. Antiviraux phase précoce

i. Cible : pUL97 (phase précoce et tardive)

La protéine virale pUL97, sérine thréonine kinase, joue un rôle clef dans la synthèse de l'ADN viral et dans l'export des capsides néoformées. La délétion de la région *UL97* dans le génome viral ou l'inhibition pharmacologique de l'activité de cette protéine réduit la réplication virale à différents stades (phase précoce ou tardive) (Prichard et al. 1999; Wolf et al. 2001; Marschall et al. 2005).

La protéine kinase pUL97 :

- ❖ catalyse la phosphorylation de la protéine accessoire pUL44, agissant ainsi sur la synthèse de l'ADN viral, qui peut alors être mûré puis encapsidé dans les capsides néoformées (Marschall et al. 2003)
- ❖ déclenche la dislocation de la lamina nucléaire par phosphorylation avec la protéine cellulaire p32, permettant l'export des capsides hors du noyau (Marschall et al. 2005; Prichard et al. 2005)

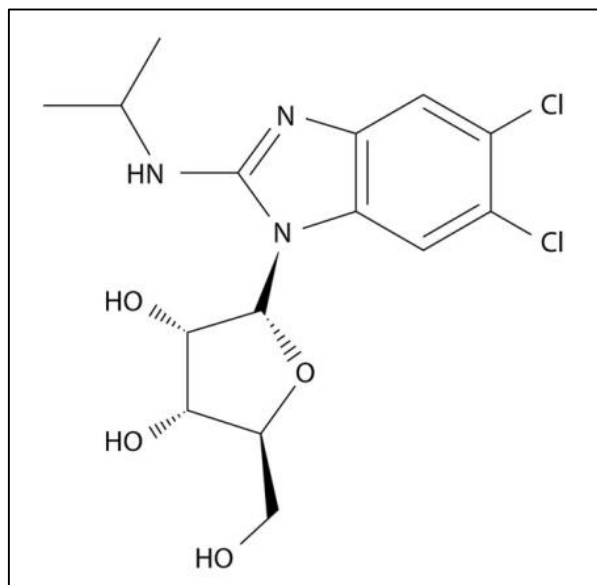


Figure 34 : Structure chimique du Maribavir

- ❖ phosphoryle la protéine pp65. Cette phosphorylation inhibe l'agrégation de pp65 au niveau du noyau de la cellule hôte et permet ainsi la phase de tégumentation des néovirions dans le cytoplasme.

Plusieurs molécules antivirales ont montré une action inhibitrice sur l'activité de la protéine kinase pUL97.

Maribavir

Le **maribavir** (MBV) ou **1-(β-L-ribofuranosyl)-2-isopropylamino-5,6-dichlorobenzimidazole** ou **1263W94** appartient à la classe des benzimidazoles L-riboside (Figure 34).

In vitro, le maribavir inhibe spécifiquement la kinase virale pUL97 du CMV en se fixant à son site catalytique (Biron et al. 2002; Biron 2006), ce qui conduit à l'inhibition de la sortie des nucléocapsides virales hors du noyau (Wolf et al. 2001; Krosky et al. 2003). Plusieurs mutations dans le gène de *UL97* ont été identifiées (V353A, L397R, T409M, H411L/N/Y). Celles-ci confèrent une résistance du CMV à ce traitement (Lurain and Chou; Chou 2008).

Le maribavir est actuellement en phase III d'essais cliniques. La phase I a montré une forte réduction de la charge virale CMVH dans le sperme de patients VIH⁺ après 4 semaines de traitement (Lalezari et al. 2002). La phase clinique II effectuée chez des patients transplantés de moelle osseuse montre une faible antigénémie pp65 après traitement MBV (Winston et al. 2008). Ces premières phases cliniques ont été encourageantes : cette drogue est peu toxique pour les cellules et présente une bonne biodisponibilité (Wang et al. 2003; Swan et al. 2007), suggérant une utilisation thérapeutique au cours de l'infection congénitale. La phase III d'essai clinique concerne l'utilisation prophylactique de cette molécule chez les patients greffés de moelle osseuse, et la comparaison de son efficacité avec le GCV chez des transplantés de foie (2008b; 2008a). Les résultats de ces dernières études sont moins encourageants que ne l'avaient laissé espérer les premiers essais de phase I ou II.

Plusieurs mutations de la kinase virale pUL97 identifiées *in vitro* ont été observées chez des receveurs de greffe cardiaque qui présentent une résistance pour le GCV et le PFA (Strasfeld et al.).

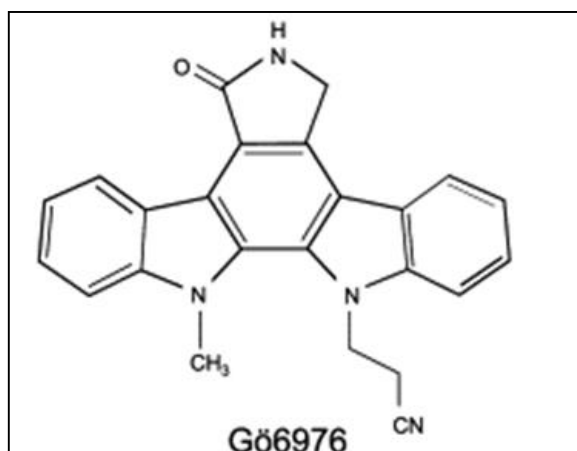


Figure 35 : Structure chimique du Gö6976

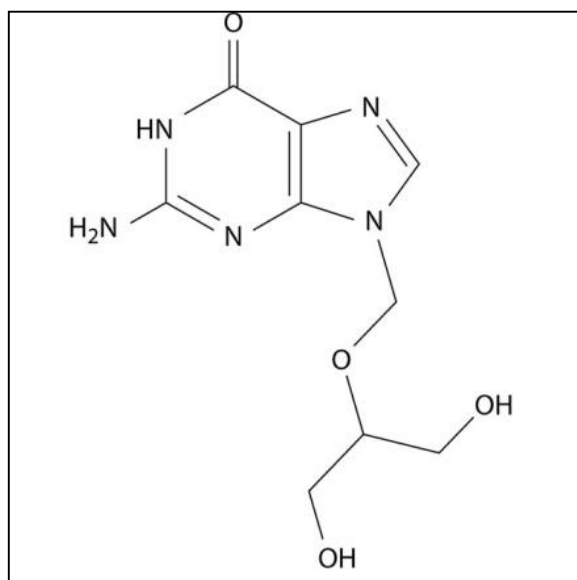


Figure 36 : Structure chimique du Ganciclovir

Le maribavir est inefficace contre la réplication virale suite à l'émergence de mutations du gène *UL27* (Komazin et al. 2003; Chou et al. 2004; Chou 2009). Le rôle de la protéine pUL27 n'est pas encore totalement élucidé. La délétion du gène *UL27* conduit à une réduction de la réplication virale *in vitro* mais n'a pas d'incidence sur la réplication *in vivo* (Prichard et al. 2006).

Indolocarbazoles : Gö6976 et NGIC-I

Les **indolocarbazoles** sont des inhibiteurs de la réplication du CMV. Ils inhibent les kinases sérine/thréonine de la famille des protéines kinases C (PKC) et la kinase virale pUL97 (Goekjian and Jirousek 1999; Pindur et al. 1999). L'administration de **Gö6976** ou **NGIC-I** conduit à une réduction de l'activité de phosphorylation de pUL97 (Marschall et al. 2001) (Figure 35).

iii. Cible : pUL54, polymérase virale

La protéine virale pUL54 est l'ADN polymérase du CMV. Elle permet la réplication du virus dans la cellule hôte. Cette protéine est une des cibles thérapeutiques anti-cytomégalo virus. Plusieurs molécules inhibent son activité, telles que le ganciclovir, le cidofovir, le foscarnet ou l'aciclovir.

Ganciclovir

Le **ganciclovir** (GCV) ou **9-(1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl)-guanine** est un nucléoside synthétique analogue à la 2-déoxyguanosine (Figure 36). Son activation nécessite trois phosphorylations assurées par des protéines kinases virales et cellulaires. Il est tout d'abord phosphorylé par la protéine virale pUL97 (Littler et al. 1992), puis par deux kinases cellulaires, la guanylate kinase et la phosphoglycérate kinase pour devenir actif sous forme triphosphatée (Matthews and Boehme 1988).

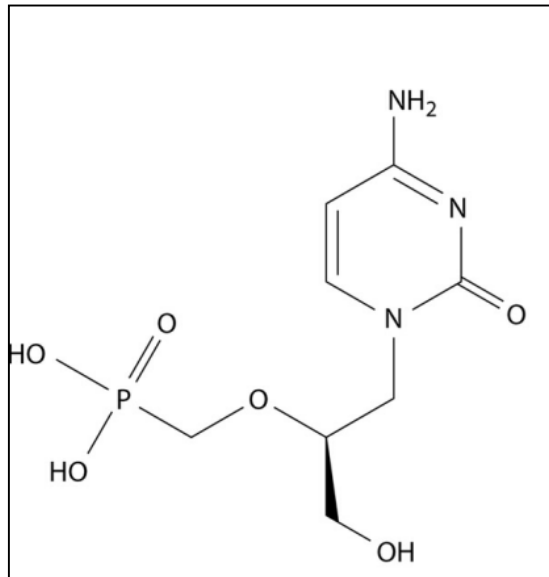


Figure 37 : Structure chimique du Cidofovir

Le GCV triphosphate inhibe la synthèse de l'ADN viral à deux niveaux : par l'inhibition compétitive de l'ADN polymérase virale et par l'inhibition de l'élongation de l'ADN viral (Matthews and Boehme 1988).

Le ganciclovir est le premier agent antiviral approuvé pour le traitement des rétinites à cytomégalovirus chez des patients au stade SIDA (1989).

Le ganciclovir peut être administré par voie intraveineuse, orale ou intra-vitréenne. Son traitement prolongé conduit parfois à des effets indésirables (neutropénie, anémie, thrombocytopenie) et à l'émergence de mutations, conduisant à son inefficacité.

Cidofovir et ses prodrogues

○ **Cidofovir**

Le **cidofovir** (CDV) ou (HPMPC) ou **1-(3-hydroxy-2-phosphonylméthoxypropyl) cytosine** est un analogue de la cytidine (Figure 37). Cette molécule a un effet antiviral contre les adénovirus, les polyomavirus, les orthopoxvirus et le CMV (Snoeck et al. 1988; Snoeck and De Clercq 2002). Il nécessite une double phosphorylation pour devenir actif. A l'inverse du GCV, les phosphorylations sont indépendantes de la phosphotransférase virale pUL97 et sont réalisées uniquement par des kinases cellulaires (Cihlar and Chen 1996). Le cidofovir inhibe l'ADN polymérase pUL54 en s'intégrant dans la chaîne d'ADN lors de l'élongation. Le traitement prolongé du CDV conduit à l'émergence de mutations d'UL54, conduisant à l'inefficacité de cette molécule (Gilbert et al. 2002).

Son application thérapeutique est limitée en raison de sa néphrotoxicité et de son manque de biodisponibilité orale (Jacobson 1997; Safrin et al. 1997). L'accumulation de cette molécule dans les cellules des tubules du canal proximal du rein conduit à des dommages des tubules proximaux (Lalezari et al. 1995).

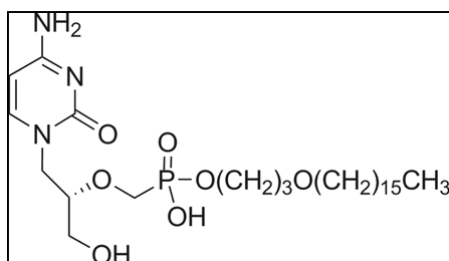


Figure 38 : Structure chimique du CMX001

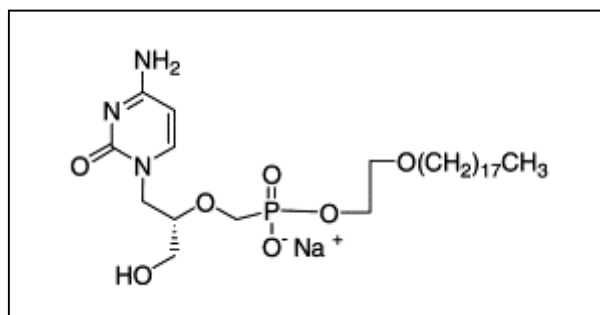


Figure 39 : Structure chimique de l'ODE-CDV

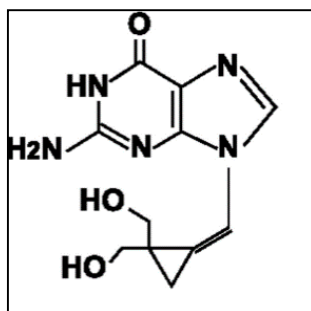


Figure 40 : Structure chimique du Cyclopropavir

- **Cidofovir cyclique**

Le **cidofovir cyclique CHPMPC** est une prodrogue du cidofovir. Il est converti en cidofovir après son entrée dans la cellule par la phosphodiesterase cyclique cellulaire CMP (Mendel et al. 1997). Cette molécule est ainsi moins toxique pour les cellules rénales que le CDV *in vivo* (Bischofberger et al. 1994) (Hitchcock et al. 1996).

- **CMX001 (HDP-CDV) et ODE-CDV**

Le **CMX001** ou **hexadecyloxypropyl** ou **HPD-CDV** et l'**ODE-CDV** ou **octadecyloxyethyl** sont des esters lipidiques, prodrogues du CDV (Figure 38, 39). Ces deux molécules ont une efficacité antivirale supérieure à celle du CDV *in vitro*, contre les herpes virus y compris le CMV (Williams-Aziz et al. 2005). Ces traitements sont efficaces contre les souches virales résistantes au GCV.

- **Cyclopropavir et autres analogues méthylencyclopropane**

Les analogues des **méthylencyclopropane** ont montré une activité antivirale (Kern et al. 2004a). La 1^{ère} génération de molécules synthétisées correspond à des analogues de l'aciclovir, et la 2^{ème} génération à des analogues du ganciclovir. Les isomères Z- et E- ont été synthétisés dans les deux générations.

Les isomères Z- de 1^{ère} génération inhibent la réplication virale de nombreux herpes virus (Qiu et al. 1998b; Qiu et al. 1998a; Rybak et al. 1999; Rybak et al. 2000; Chen et al. 2003; Kushner et al. 2003). Ces molécules ont une forte activité antivirale contre le CMV humain, murin, de rat, de cochon d'Inde et de macaque rhésus (Rybak et al. 2000). Parmi ces molécules, certaines réduisent la mortalité et la réplication virale chez des souris infectées par la souche murine ou humaine (Rybak et al. 1999; Kern et al. 2004a).

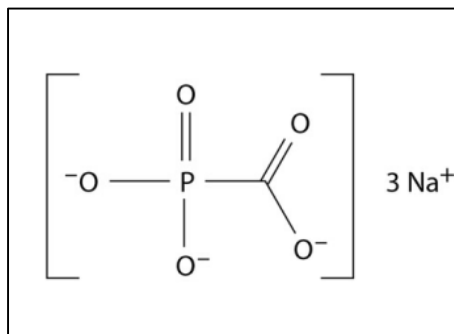


Figure 41 : Structure chimique du Foscarnet

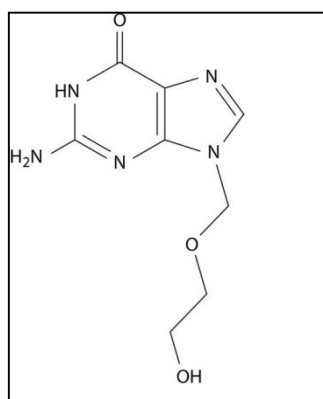


Figure 42 : Structure chimique de l'Aciclovir

Parmi les analogues de 2nde génération, le **ZSM-I-62**, nommé **cyclopropavir (CPV)**, réduit la réplication virale de la souche MCMV dans les organes des souris et de la souche humaine CMVH dans du tissu fœtal humain greffé chez des souris immunodéficientes (Kern et al. 2004b) (Figure 40). La mortalité des souris infectées par le MCMV est réduite suite au traitement.

Le cyclopropavir nécessite une phosphorylation par la protéine virale pUL97 pour être actif (Gentry et al. 2010). *In vitro*, il est actif contre d'autres herpes virus : le HHV-6 et le HHV-8 (Kern et al. 2005).

Des dérivés du CPV, des analogues méthylencyclopropane halogénés ont également été synthétisés. Ces molécules présentent une activité antivirale contre le CMV, le virus d'Epstein Barr, de l'herpès simplex ou du virus de la varicelle zona (Zhou et al. 2004; Zhou et al. 2007; Zhou et al. 2009) ; mais leur efficacité est moindre par rapport au CPV *in vitro* et *in vivo*.

Foscarnet

Le **foscarnet (PFA)** ou **acide phosphonoformique** est un analogue des pyrophosphates (Figure 41). Il inhibe sélectivement la réplication virale dans les cellules infectées. Il agit en bloquant directement, et de façon non compétitive, le site du récepteur au pyrophosphate de l'ADN polymérase pUL54, induisant une suppression de la réplication virale (Crumpacker 1992; Wagstaff and Bryson 1994). Contrairement au GCV et au CDV, l'activité antivirale du PFA ne nécessite pas de phosphorylation.

Le foscarnet est choisi de préférence chez les patients préalablement traités au GCV qui présentent une résistance au GCV ou chez les patients ne pouvant pas être traités au GCV en raison d'une neutropénie (diminution des polynucléaires sanguins) ou d'une leucopénie (réduction des leucocytes totaux sanguins) (Razonable and Emery 2004).

Le foscarnet est peu utilisé comme traitement curatif chez les transplantés d'organes, en raison de sa neurotoxicité et de sa néphrotoxicité.

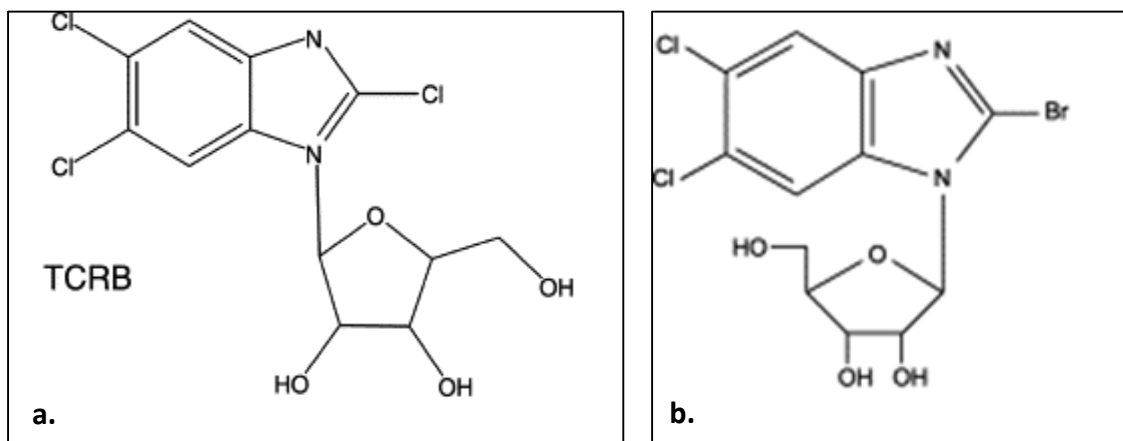


Figure 43 : Structure chimique du TCRB (a) & du BDCRB (b)

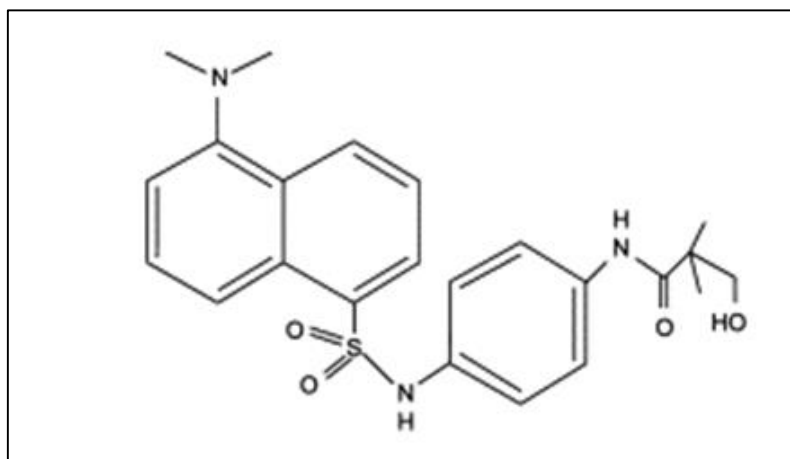


Figure 44 : Structure chimique du BAY 38-4766

Aciclovir

L'**aciclovir** (ACV) est un analogue de la 2-deoxyguanosine. Il doit être triphosphorylé pour être actif (Figure 42). Tout comme le GCV, l'aciclovir est tout d'abord phosphorylé par la kinase virale pUL97, puis par deux kinases cellulaires.

L'aciclovir a une action anti-CMV en bloquant le site catalytique de l'ADN polymérase virale, ce qui conduit à un arrêt de l'élongation de l'ADN. *In vitro*, cette molécule est moins efficace que le GCV contre l'infection à CMV. L'aciclovir est utilisé en prophylaxie chez les patients immunodéprimés, principalement sous forme de sa prodrogue, le valaciclovir (Lowance et al. 1999).

L'aciclovir est peu toxique, mais peut conduire dans de rares cas à des néphropathies.

iii. Cibles pUL56/pUL89

L'encapsidation de l'ADN viral fait appel à plusieurs protéines virales pUL56, pUL89 et pUL104. Ces terminases permettent la reconnaissance, le clivage et la translocation des unités de génome dans les capsides néoformées. Le complexe pUL56/pUL89 préalablement formé, se fixe à pUL104 afin de transférer l'ADN dans la capside. Plusieurs traitements ciblent ce complexe et empêchent ainsi la viabilité des virions infectieux néoformés.

Benzimidazoles ribosides : TCRB et BDCRB

Le **TCRB** ou **2,5,6-trichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole** et son dérivé le **BDCRB** ou **1H- β -D-ribofuranoside-2-bromo-5,6-dichlorobenzimidazole** empêchent la réplication de l'ADN viral du CMV (Figure 43). Ces deux molécules inhibent le clivage des concatémères de l'ADN viral en interagissant avec le complexe protéique pUL56/pUL89 (Krosky et al. 1998; Underwood et al. 1998; Underwood et al. 2004).

Le BDCRB a une forte action antivirale contre le CMV *in vitro* (Townsend et al. 1995; Chulay et al. 1999; Zou et al. 2000) et *in vivo* (Kern et al. 2004c).

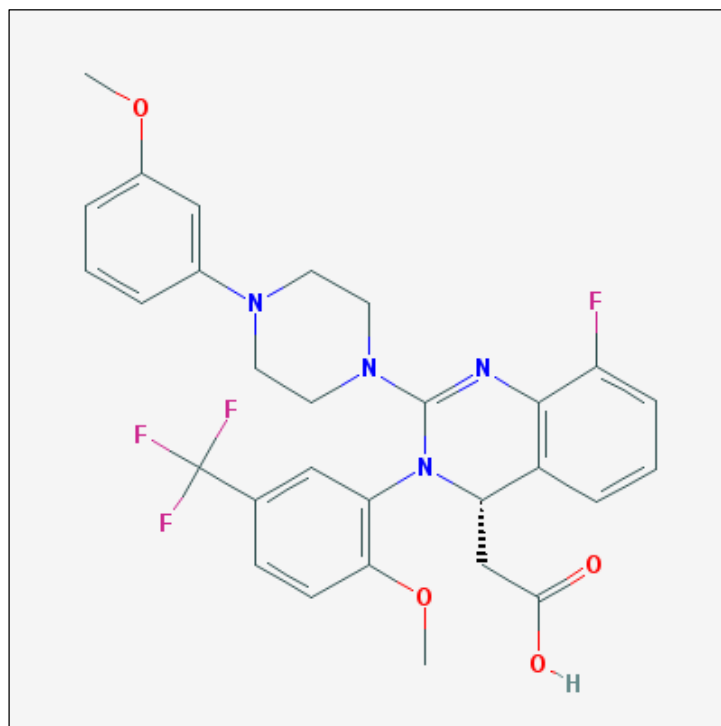


Figure 45 : Structure chimique du Létermovir

Le BDCRB est relativement peu toxique pour les lignées cellulaires de laboratoire ou les cultures primaires de cellules souches de la moelle osseuse (Townsend et al. 1995; Nassiri et al. 1996).

L'administration de TCRB ou de BDCRB conduit à l'émergence de mutations dans les gènes d'*UL56* et *UL89*, rendant ces molécules inefficaces (Krosky et al. 1998; Underwood et al. 1998).

BAY 38-4766 (Toméglovir)

La molécule **BAY 38-4766** ou **3-hydroxy-2,2-diméthyl-N-[4([5-(diméthylamino)-1-naphthyl]sulfonylamino)-phenyl]propanamide** appartient à la nouvelle classe des agents anti-CMV non nucléosidiques (Figure 44).

BAY 38-4766 agit sur le clivage et le packaging des concatémères de l'ADN viral *via* les protéines virales du CMV pUL56 et pUL89 (Williams et al. 2003; Nixon and McVoy 2004). Cette molécule a un fort pouvoir inhibiteur contre le CMVH *in vitro* (Reefschlaeger et al. 2001). Il est capable d'inhiber la réplication virale d'isolats cliniques CMVH sensibles et résistants au GCV (McSharry et al. 2001).

BAY 38-4766 semble être un bon candidat anti-CMV en raison de sa faible toxicité cellulaire et de sa bonne biodisponibilité orale (Buerger et al. 2001; McSharry et al. 2001; Weber et al. 2001; Evers et al. 2002).

AIC246 : Létermovir (Figure 45)

Cette molécule inhibe les stades tardifs de la réplication virale en inhibant le clivage et le packaging de l'ADN viral médiés par les protéines du complexe terminases (Goldner et al. 2011). *In vitro*, la molécule AIC246 montre une efficacité contre des isolats cliniques de CMVH, incluant des souches résistantes au GCV (Lischka et al. 2010).

Contrairement à la souche humaine, le CMV murin n'est pas inhibé par AIC246 *in vitro* (Lischka et al. 2010).

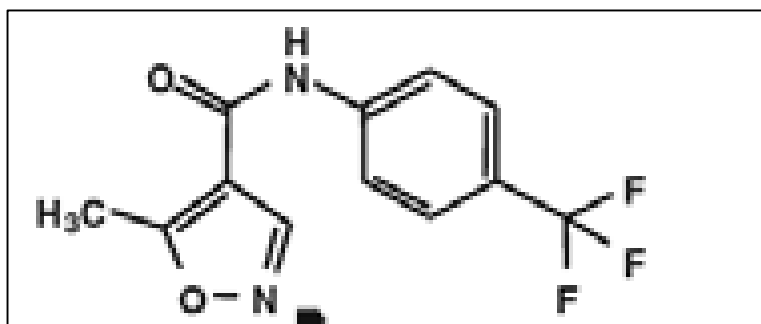


Figure 46 : Structure chimique du Léflunomide

In vivo, cette molécule a été testée chez des souris implantées avec des cellules humaines infectées par le CMVH. Ces cellules sont renfermées dans une matrice de « gelfoam ». L'administration d'AIC246 conduit à une réduction de l'infection virale dans les cellules (Lischka et al. 2010).

c. Antiviraux phase tardive

Léflunomide

Le **léflunomide** ou **N-[4-trifluorométhylphényl]-méthylisoxazol-4-carboxamide** est un dérivé isoxazol (Figure 46). Il est métabolisé en une forme active : le tériflunomide (N-[4-trifluoro-méthylphényl]-2-cyano-3-hydroxycrotoamide).

Le léflunomide est un immunosuppresseur couramment prescrit pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, une pathologie auto-immune. Le léflunomide agit à différents niveaux dans l'inhibition du système immunitaire ; il inhibe la prolifération des lymphocytes B et T, *via* l'inhibition de la dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) et *via* l'inhibition de la phosphorylation de tyrosines kinases cellulaires impliquées dans l'activité des LB et LT (Chong et al. 1999).

Le léflunomide a montré une efficacité anti-RCMV chez le rat (15 g/kg/jour pendant 14 jours). Il réduit de 75 à 99 % la charge virale dans différents organes (glandes salivaires, poumons, rate), contre 85 à 99 % chez les rats traités aux GCV (10 mg/kg/jour pendant 5 jours) (Waldman et al. 1999b; Waldman et al. 1999a).

Le léflunomide inhibe la réplication du cytomégalo virus humain (Waldman et al. 1999b; Waldman et al. 1999a). Il agit au stade tardif de la réplication virale en empêchant l'acquisition du tégument aux néovirions. Les virions nouvellement formés sont immatures, sans tégument (Waldman et al. 1999a). En clinique, il a été testé dans une cohorte de transplantés de reins présentant une maladie à CMV. 88 % des patients répondent à la molécule : ils présentent une clairance virale dans le sang et une guérison des organes atteints après traitement (John et al. 2005; Sudarsanam et al. 2006). Toutefois, son application thérapeutique est limitée en raison de ses effets hépatotoxique et tératogène.

E) Modèles animaux d'infection à CMV utilisés pour le développement d'antiviraux

I) Généralités sur les modèles d'infection à CMV *in vivo*

Les modèles animaux permettent l'étude physiopathologique d'une infection et les possibilités des traitements de cette infection. Les modèles animaux miment, non seulement, les manifestations cliniques d'une pathologie humaine, mais aussi, reproduisent, aussi fidèlement que possible, les diverses conditions physiologiques ou pathologiques dans lesquelles cette pathologie se développe chez l'homme. Des modèles animaux ont été développés pour l'étude de l'infection humaine par le CMV. Parmi eux, des modèles de manifestations cliniques (rétinites, myocardites, déficits neurosensoriels, athérosclérose) et des modèles de situations cliniques (infections congénitales et/ou néonatales, modèles d'immunosuppression).

Les souches virales de CMVH qui infectent l'homme ont une spécificité d'espèce qui rend impossible leur utilisation dans les modèles animaux classiques. Des modèles infectés par des souches virales spécifiques de chaque espèce ont été développés : le RCMV est spécifique au rat, le RhCMV au macaque rhésus, le MCMV à la souris et le GPCMV au cochon d'Inde.

II) Modèles d'étude d'efficacité des antiviraux

a. Modèles d'infection souris

Les modèles d'infections souris sont les modèles animaux les plus utilisés pour tester l'efficacité de nouvelles molécules dirigées contre le CMV.

Les souris BALB/c, sensibles au virus sauvage MCMV sont le plus couramment utilisées (Notons que certaines souches de souris sont résistantes aux souches virales MCMV, telles que les souris C57BL/6 (Lee et al. 2003; Voigt et al. 2003)).

Des modèles murins d'immunosuppression (en rapport avec le VIH ou les transplantés) ou de myocardite liée à l'infection par le CMV ont été développés (La souris n'est pas un bon modèle pour l'étude de l'infection congénitale. La gestation de ces animaux étant courte, environ 21 jours, le virus n'a pas le temps d'infecter les fœtus (Johnson 1969)).

Les modèles murins infectés par les souches virales MCMV ont permis de montrer l'efficacité de plusieurs antiviraux dirigés contre le CMV : il s'agit du ganciclovir, du cidofovir et du foscarnet. Ces molécules ont par la suite montré une efficacité chez les patients (Buhles et al. 1988; Crumacker et al. 1988; Dieterich et al. 1988; Walmsley et al. 1988; Polis and Masur 1995; Jacobson 1997; Lalezari 1997a, 1997b; Lalezari and Kuppermann 1997; Lalezari et al. 1997; Safrin et al. 1997; Jacobson et al. 1999).

Les modèles murins étudient l'efficacité des antiviraux sur des souches de CMV spécifiques à la souris. De nouveaux modèles expérimentaux ont été développés afin de contourner cette approximation. L'approche technique consiste à greffer sur la souris des cellules humaines ou des tissus humains, eux-mêmes infectés par du CMVH. La souche de CMVH utilisée préférentiellement est la souche humaine Toledo. Sa séquence d'ADN est proche de celle des souches sauvages (contrairement aux souches AD169 et Towne qui le sont moins) (Cha et al. 1996). Ces modèles sont développés sur des souris immunodéficientes afin d'éviter le rejet de la xénogreffe.

Les modèles d'infection à CMVH chez la souris SCID empruntent deux approches : la première consiste à greffer des cellules humaines telles que des fibroblastes embryonnaires humains enfermés dans une matrice artificielle d'agarose (Allen et al. 1992) ou de « gelfoam » (Bravo et al. 2007) ; la seconde consiste à greffer du tissu humain chez les souris.

i. Souris SCID greffées avec des cellules humaines

✚ Modèle agarose

Le GCV a été testé dans un modèle de souris immunodéficientes (souris CD-1, Charles River) recevant par voie intrapéritonéale (i.p) des fibroblastes embryonnaires (MRC-5) préalablement infectés par la souche AD169 en culture enfermés dans une matrice d'agarose.

GCV sous-cutané (mg/kg/jour)	100	50	25
% réduction réplication virale	92,5	73	20,6

Tableau 11 : Effet du traitement GCV, administré en sous-cutané, sur la réplication virale dans les implants de souris inoculées avec du CMVH

(Modifié d'après Allen et al. 1992)

Les souris sont traitées au GCV 4h avant l'implantation des cellules en sous-cutané, puis deux fois par jour pendant 4 jours. Cinq jours post-implantation, les cellules enfermées dans l'agarose sont récupérées. Les résultats révèlent que plus la concentration en GCV administrée est importante et plus la réplication virale est inhibée (Allen et al. 1992) (Tableau 11).

Modèle « gelfoam »

Ce modèle consiste à introduire dans une matrice de « gelfoam » (éponge), une suspension cellulaire de fibroblastes (HFF) préalablement infectée par la souche virale HV5.111, souche Toledo qui exprime la protéine « *Green Fluorescent Protein* » (GFP) à une multiplicité d'infection de 0,01 (correspondant à l'infection d'une cellule sur 100 cellules totales) (Bravo et al. 2007). 24 heures après, les souris sont greffées avec l'implant en sous-cutané au niveau dorsal. L'efficacité du GCV et du CDV a été vérifiée : le CDV présente une activité antivirale supérieure à celle du GCV. L'administration i.p de CDV (25 mg/kg/jour) ou de GCV (100 mg/kg/jour) à J7 post-greffe pendant 7 jours conduit à une forte réduction de la charge virale dans les implants (1,56 +/- 0,4 pour le groupe CDV ; 2,07 +/- 0,62 pour le groupe GCV ; contre 3,51 +/- 0,31 log₁₀ pfu/ml pour le groupe placebo). L'efficacité antivirale de ces traitements laisse supposer que les implants sont viables et vascularisés au cours du temps post-greffe.

La molécule AIC246 a également été testée dans ce modèle. En revanche, afin d'améliorer la vascularisation des implants, ceux-ci reçoivent une injection de facteurs de croissance pour fibroblastes une heure avant la greffe. Cette molécule est administrée *per os* 4 heures post-greffe, et 1 fois/jour pendant 9 jours. La charge virale de la souche Davis de CMVH est fortement réduite, d'environ 100 fois moins, suite au traitement de 30 mg/kg d'AIC246 par rapport au contrôle (Lischka et al. 2010).

GCV per os ($\mu\text{g/ml}$)	0	125	500	1500
Nombre pfu/greffon	5.10^5	1.10^5	2.10^4	$2,5.10^2$

Tableau 12 : Effet du traitement GCV, administré par voie orale, sur la réplication virale dans les greffons de souris inoculées avec du CMVH

(Modifié d'après Mocarski et al. 1993)

GCV i.p (mg/kg/j)	0	8	40
Nombre pfu/greffon	$1,5.10^7$	2.10^5	1.10^3

Tableau 13 : Effet du traitement GCV, administré par voie intrapéritonéale, sur la réplication virale dans les greffons de souris inoculées avec du CMVH

(Modifié d'après Mocarski et al. 1993)

	J14 p.i	J21 p.i	J28 p.i	J35 p.i
Placebo	73%*	56%	50%	56%
GCV 45 mg/kg (i.p)	0%	0%	29%	17%
CPV 45 mg/kg (per os)	0%	0%	0%	0%

Tableau 14 : Effet des traitements GCV et CPV sur la réplication du CMVH dans les implants de thymus/foie chez la souris SCID

****Pourcentage d'implants positifs au CMV***

(Modifié d'après Kern et al. 2004)

	J14 p.i	J21 p.i	J28 p.i	J35 p.i
Placebo	45 %*	36 %	64 %	80 %
MBV 100 mg/kg per os	10 %	20 %	0 %	20 %

Tableau 15: Effet du traitement MBV sur la réplication virale dans les implants de thymus/foie

**Pourcentage d'implants positifs au CMV*

(Modifié d'après Kern et al. 2004)

	J14 p.i	J21 p.i	J28 p.i	J35 p.i
Placebo	3,98*	4,83	4,97	5,93
MBV 100 mg/kg per os	2,7	2,73	0	3,54

Tableau 16 : Effet du traitement MBV sur la réplication virale du CMVH dans les implants de thymus/foie

** Quantité de CMV en log 10 pfu/g*

(Modifié d'après Kern et al. 2004)

ii. Souris SCID greffées avec du tissu humain

Modèle thymus/foie

Dans un modèle de souris SCID-humanisées, des tissus de thymus et de foie humains sont greffés dans les capsules rénales de souris (Mocarski et al. 1993). L'infection CMVH est réalisée 12 à 14 semaines post-greffe dans les implants. L'efficacité du GCV a été vérifiée par deux types d'administration : l'administration *per os* et l'injection par voie intrapéritonéale. Six heures post-infection (10^6 pfu souche Toledo), les souris reçoivent 125, 500 ou 1500 µg/ml de GCV *per os*. L'administration de GCV par i.p est effectuée 4h post infection. Les greffons sont récupérés 12 jours post infection. Ils sont soniqués et le titre viral de chacun est mesuré par essai antiviral sur des fibroblastes embryonnaires humains (HFF). Les résultats démontrent d'une part, une efficacité importante du GCV contre la réplication du CMVH dans ce tissu, et d'autre part, que l'efficacité antivirale est comparable entre l'administration *per os* et l'injection i.p (Mocarski et al. 1993) (Tableaux 12, 13). Ce modèle a également permis d'étudier l'efficacité du cyclopropavir, des benzimidazoles (MBV et BDCRB) et des esters de CDV (HDP-CDV et ODE-CDV) (Kern et al. 2004b; Kern et al. 2004c).

L'administration par voie orale de CPV 24h post-infection (45 mg/kg/jour pendant 28 jours) inhibe totalement la réplication virale du CMV dans les implants aux différents temps post-infection (J14, 21, 28 et 35) (Tableau 14).

Contrairement au modèle de rétinite à CMV, le BDCRB (33 ou 100 mg/kg/jour pendant 28 jours) présente une activité antivirale dans les implants, et notamment à J28 post-infection (11 % d'implants CMV⁺ sous traitement contre 67 % dans le groupe placebo). Le maribavir est efficace contre le virus aux différents temps post-infection, et inhibe totalement l'infection virale à J28 (Tableaux 15, 16).

Les esters de CDV (HDP-CDV et ODE-CDV) administrés par voie orale montrent une efficacité antivirale de 4 à 8 fois plus importante que celle du CDV (administré par i.p) dans ce modèle, ainsi que dans le modèle de rétinite.

	J7 p.i	J14 p.i	J21 p.i	J28 p.i
Placebo	33%*	75%	83%	80%
GCV 45 mg/kg (i.p)	0%	0%	0%	17%
CPV 45 mg/kg (per os)	0%	0%	0%	0%

Tableau 17: Effet des traitements GCV et CPV sur la réplication du CMVH dans les implants de tissu rétinien chez la souris SCID

**Pourcentage d'implants positifs au CMV*

(Modifié d'après Kern et al. 2004)

	J10 p.i	J21 p.i	J42 p.i
Placebo	40 %*	70 %	60 %
CDV 25 mg/kg i.p	0 %	10 %	30 %

Tableau 18 : Effet du traitement CDV sur la réplication du CMVH dans les implants de tissu rétinien chez la souris SCID

**Pourcentage d'implants positifs au CMV*

Le traitement est administré 1 fois/jour pendant 14 jours, puis trois fois pendant les 14 jours suivants. Le traitement est arrêté au bout de 28 jours.

(Modifié d'après Kern et al. 2001)

Modèle rétinite

Un modèle d'infection à CMV a été développé pour l'étude des rétinites à CMV chez des souris SCID-humanisées (Bidanset et al. 2001, 2004). Ce modèle consiste à implanter du tissu fœtal humain de rétine dans la chambre antérieure de l'œil des souris. Quatre à 9 semaines post-greffe, les implants sont infectés par 2000 à 7500 pfu de CMVH (souche Toledo). Les charges virales sont détectées dans les implants à différents temps post-infection. L'efficacité du GCV, du CPV, du CDV, des benzimidazoles (MBV et BDCRB) ainsi que des dérivés du CDV (HDP-CDV et ODE-CDV) a été vérifiée (Bidanset et al. 2004; Kern et al. 2004a; Kern et al. 2004b; Kern et al. 2004c).

L'administration de 45 mg/kg de GCV (i.p) ou de CPV (*per os*) conduit à une inhibition quasi-totale de l'infection virale (Tableau 17). Le CPV inhibe fortement la réplication virale, et d'autant plus lorsque l'administration de cette drogue est effectuée précocement par rapport à l'infection provoquée. De plus, l'arrêt du traitement de CPV à J28 post-infection conduit à une réactivation virale, observée à J42 (Tableau 18).

L'administration i.p de BDCRB (50 ou 75 mg/kg/jour pendant 28 jours) n'a pas d'effet contre l'infection CMVH, contrairement au MBV, administré *per os* (75 mg/kg 2 fois/jour pendant 14 jours, puis 1 fois/jour pendant 14 jours) qui réduit d'environ 4 fois la charge virale dans les implants par rapport au placebo à J21 post-infection.

iii. Modèles d'infection à MCMV

Le modèle souris permet l'étude de la propagation virale dans les organes, reflétant l'infection naturelle acquise chez les patients immunocompétents et immunodéficients. Ce modèle nécessite l'infection *via* une souche murine MCMV.

Plusieurs analogues des Z- ou E-méthylencyclopropane ont montré une efficacité antivirale contre le CMVH et le MCMV *in vitro* (Qiu et al. 1998b; Qiu et al. 1998a). Ces molécules ont été testées chez la souris BALB/c en comparaison au ganciclovir (Rybak et al. 1999).

Traitements	Nombre de décès de souris	% mortalités
Placebo / QYL-438	13/15	87
QYL-438 50 mg/kg +6h	2/15	13
QYL-438 5,6 mg/kg +6h	10/15	67
QYL-438 50 mg/kg +48h	6/15	40
QYL-438 5,6 mg/kg +48h	15/15	100
Placebo / GCV	14/15	93
GCV 50 mg/kg +6h	0/15	0
GCV 5,6 mg/kg +6h	2/15	13
GCV 50 mg/kg +48h	2/15	13
GCV 5,6 mg/kg +48h	13/15	87

Tableau 19 : Effet des traitements GCV et Synguanol sur la mortalité des souris inoculées avec du MCMV

(Modifié d'après Rybak et al. 1999)

Traitements	Nombre de décès de souris	% mortalités
Placebo / QYL-284A	15/15	100
QYL-284A 50 mg/kg +6h	5/15	33
QYL-284A 5,6 mg/kg +6h	13/15	87
QYL-284A 50 mg/kg +48h	13/15	87
QYL-284A 5,6 mg/kg +48h	15/15	100
Placebo / GCV	15/15	100
GCV 50 mg/kg +6h	0/15	0
GCV 5,6 mg/kg +6h	9/15	60
GCV 50 mg/kg +48h	7/15	47
GCV 5,6 mg/kg +48h	9/15	60

Tableau 20 : Effet des traitements GCV et Synadenol sur la mortalité des souris inoculées avec du MCMV

(Modifié d'après Rybak et al. 1999)

Les souris infectées (2.10^5 pfu souche murine Smith, voie intrapéritonéale) sont traitées par voie i.p pendant 5 jours avec du GCV, du QYL-284A (Synadenol) ou du QYL-438 (Synguanol) (5,6 ou 50 mg /kg/jour) à différents temps post-infection (+6h, +24h ou +48h). Ces trois molécules réduisent la mortalité des souris, et ce d'autant plus, lorsque le traitement est administré précocement après l'infection virale (Tableaux 19, 20).

L'efficacité antivirale du cyclopropavir a également été mesurée (Kern et al. 2004b). Cette molécule présente une meilleure efficacité antivirale lorsqu'elle est administrée par voie orale, que par voie i.p. Le CPV réduit fortement la mortalité des souris CMV⁺. Il est plus efficace que le GCV (10 mg/kg/jour, *per os*) contre la mortalité des souris ainsi que contre la réplication virale du MCMV. En effet, les organes (foie, poumons, rate, reins, pancréas) des souris présentent une réduction des charges virales de MCMV en présence de CPV (10 mg/kg, *per os*), et plus particulièrement dans le foie.

La molécule BAY 38-4766 a été testée contre la souche virale MCMV *in vivo* chez des souris SCID, utilisées comme modèle d'immunodépression (Weber et al. 2001). Ce traitement conduit à une forte réduction de l'infection virale, détectée dans divers organes (poumons, reins et glandes salivaires). L'infection est d'autant plus réduite en présence de fortes concentrations de BAY 38-4766 (3 à 100 mg/kg, *per os*). Ces résultats sont semblables pour le traitement au GCV (Tableaux 21, 22).

b. Modèles d'infection rat

L'infection de rats immunocompétents avec la souche virale RCMV conduit à une infection asymptomatique. En revanche, la dissémination virale est observée chez des rats immunodéprimés. Ces animaux sont de bons modèles d'étude de l'infection virale chez les immunodéprimés (SIDA et transplantés).

Plusieurs antiviraux ont montré leur efficacité à réduire la virulence du RCMV : le ganciclovir (Stals et al. 1991; Stals et al. 1993), le cidofovir (Stals et al. 1991; Stals et al. 1993), le foscarnet (Stals et al. 1991) ainsi que l'aciclovir (Bruggeman et al. 1987).

Le virus CMV spécifique du rat est responsable de manifestations physiopathologiques vasculaires telles que l'athérosclérose ou la sténose artérielle (Kaptein et al. 2006).

[GCV] (mg/kg)	Glandes salivaires	Poumons	Reins
0	100 %	100 %	100 %
3	20 %	7 %	10 %
10	16 %	6 %	10 %
30	2 %	3 %	10 %
100	2 %	3 %	8 %

Tableau 21 : Effet du traitement GCV contre l'infection MCMV chez la souris SCID

*** Pourcentage de tissus positifs au CMV**

(Modifié d'après Weber et al. 2001)

[BAY 38-4766] (mg/kg)	Glandes salivaires	Poumons	Reins
0	100 %	100 %	100 %
3	83 %	21 %	30 %
10	40 %	12 %	13 %
30	23 %	10 %	9 %
100	8 %	11 %	2 %

Tableau 22 : Effet du traitement BAY 38-4766 contre l'infection MCMV chez des souris immunodéficientes

*** Pourcentage de tissus positifs au CMV**

(Modifié d'après Weber et al. 2001)

L'utilisation de ce modèle pourrait aider à déterminer de nouvelles cibles du CMV pour le développement de nouvelles molécules protectrices vis-à-vis des maladies vasculaires.

c. Modèles d'infection cochon d'Inde

Le modèle cochon d'Inde a été développé pour reproduire les manifestations cliniques des maladies à CMV. Il existe deux modèles pour l'étude de la physiopathologie du GPCMV et des applications thérapeutiques : le modèle d'infection congénitale et néonatale, ainsi qu'un modèle d'immunosuppression.

Plusieurs analogues nucléotidiques anti-CMV ont été testés contre la souche virale GPCMV chez le cochon d'Inde : le ganciclovir, le cidofovir et des dérivés du CDV.

In vitro, la souche virale GPCMV est résistante au ganciclovir. A des doses cliniques, le GCV est inefficace pour combattre l'infection (Fong et al. 1987; Woolf et al. 1988). Toutefois, à forte concentration, on n'observe pas de labyrinthites ou de pertes auditives neurosensorielles, manifestations cliniques de l'infection congénitale (Woolf et al. 1988). La réduction de sensibilité du GCV pour le virus GPCMV peut s'expliquer par la différence de séquence en acides aminés du domaine catalytique, domaine indispensable à l'activation de la molécule, entre la protéine pUL97 de CMVH et la kinase homologue pGP97 chez le cochon d'Inde (Fox and Schleiss 1997). Cette hypothèse a été confirmée par la substitution de la protéine pGP97 par pUL97 dans un virus chimérique GPCMV. Cette substitution améliore la susceptibilité du virus recombinant au GCV et au MBV (McGregor et al. 2008) : l'IC₅₀ du GCV est de 125 µM et 12,5 µM pour la souche sauvage GPCMV et le virus recombinant respectivement (McGregor and Choi 2011). Contrairement au GCV, la souche GPCMV est sensible au cidofovir (Beadle et al. 2002). En raison de la néphrotoxicité du cidofovir, par son accumulation dans les cellules rénales des tubules proximaux (Lalezari et al. 1995), des dérivés du CDV ont été synthétisés (CDV cyclique, CMX001). L'efficacité de ces prodrogues a été évaluée chez le cochon d'Inde. Leur toxicité cellulaire sont inférieures à celles du CDV *in vitro* et *in vivo* (Bischofberger et al. 1994; Hitchcock et al. 1996). Le CDV cyclique semble contrecarrer l'apparition de certaines pathologies induites par le GPCMV telles que les labyrinthites et les pertes auditives neurosensorielles (Bourne et al. 2000; White et al. 2006).

L'efficacité antivirale des prodrogues du CDV, le CDV cyclique et le CMX001, a été testée *in vivo* dans un modèle d'infection congénitale à GPCMV. Ces molécules thérapeutiques réduisent la mortalité des femelles gestantes et des fœtus. Le CDV cyclique (20 mg/kg administré par i.p., 24h post-infection) empêche la transmission au fœtus du virus (virus recombinant GPCMV exprimant la GFP) : 26 % des fœtus « placebo » sont GPCMV⁺ contre 0 % dont la mère a été traitée par le CDV cyclique. Cette molécule augmente ainsi la survie des nouveau-nés (Schleiss 2006). Les femelles gestantes traitées au CDV cyclique (35 mg/kg) présentent une réduction de la charge virale dans les tissus et plus particulièrement dans le placenta (Bravo et al. 2006).

Le CMX001 (20 mg/kg administré *per os*, 24h post infection) conduit à la une augmentation des naissances : 55,6 % de naissances sans traitement contre 93,8 % de naissances chez les femelles traitées (Bravo et al. 2011). A J7 post-infection, le traitement CMX001 réduit la virémie chez la femelle gestante. La quantité d'ADN viral est également réduite dans le foie et la rate.

Les fœtus présentent une réduction des charges virales dans les organes suite au traitement de la mère : 25 % tissus CMV⁺ avec traitement contre 44 % sans traitement dans la rate ; et 57 % contre 73 % dans le foie (Bravo et al. 2011).

Le maribavir n'a pas d'effet antiviral contre les souches CMV de murin, de rat ou de cochon d'Inde *in vitro* (Williams et al. 2003). L'efficacité de cette molécule a été mesurée chez le cochon d'Inde en utilisant une souche virale recombinante (McGregor et al. 2008). La production du virus recombinant est effectuée à partir de chromosomes artificiels bactériens (BAC). Ils permettent l'insertion d'ADN viral de grande taille, tel que celui du GPCMV et de produire des virions recombinants en culture cellulaire après transfection du BAC recombinant. Le gène *GP97* du cochon d'Inde, homologue du gène *UL97* de CMVH est remplacé par le gène *UL97* de la souche CMVH Towne au sein du génome du GPCMV. Dans ce modèle, le GCV et le MBV ont été testés *in vitro* : l'IC₅₀ du GCV est améliorée chez le virus chimérique par rapport à la souche virale sauvage de cochon d'Inde (15,2 µM +/- 3 pour le virus chimérique contre 174,7 µM +/- 16 pour la souche sauvage). De la même manière, le virus recombinant améliore sa susceptibilité au MBV (IC₅₀ du MBV est égale à 14,05 µM +/- 0,8 pour la souche mutante contre 62,05 µM +/- 4,5 pour la souche sauvage).

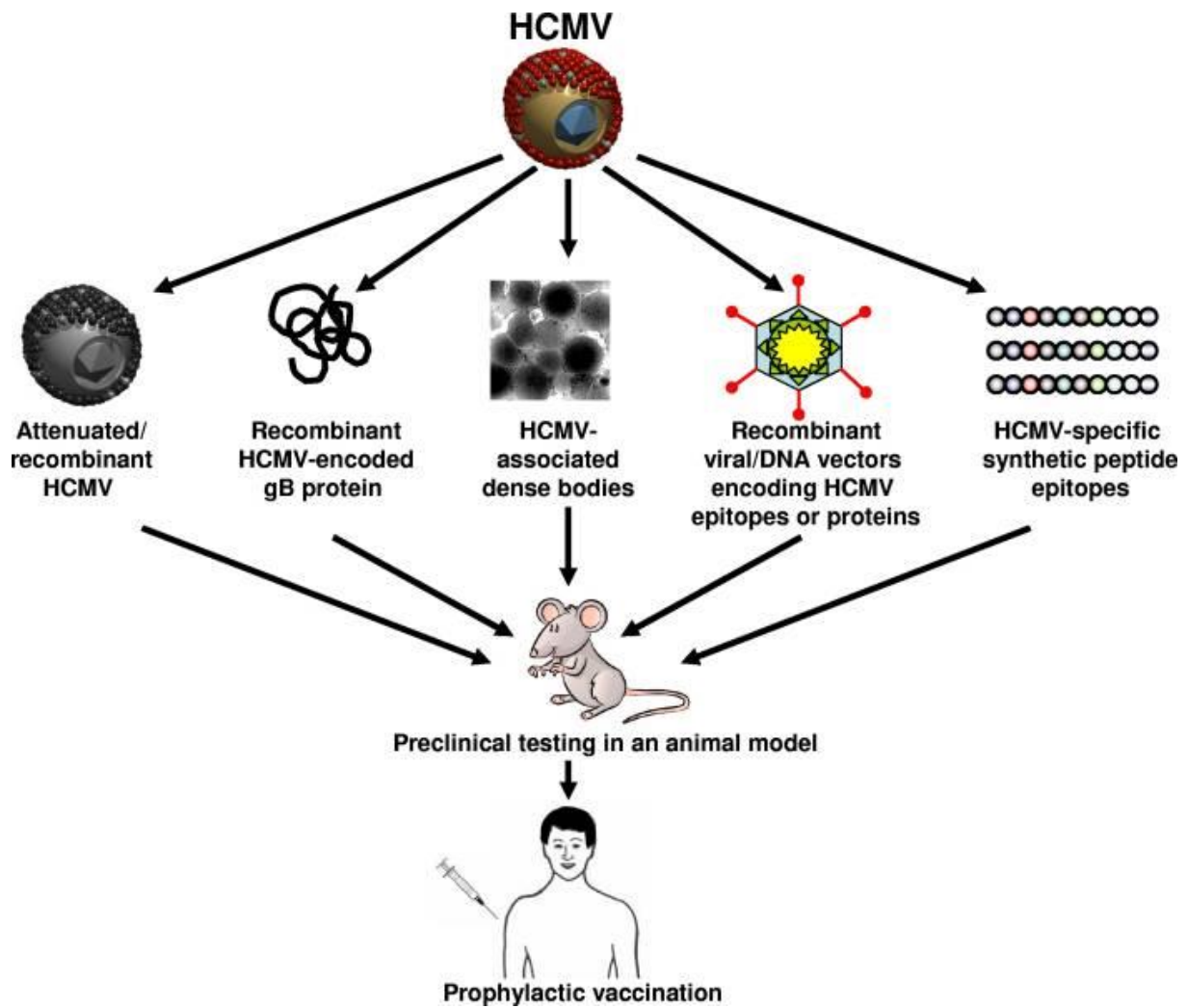


Figure 47 : Stratégies de développement de vaccins
(Crough et al. 2009)

Les différents vaccins développés incluent les virus vivants atténués, des corps denses, des protéines virales recombinantes, des virus utilisés comme vecteur (virus vaccine, canarypox) ou des épitopes de peptides synthétiques.

F) Modèles animaux d'infection à CMV utilisés pour le développement de vaccins

I) Vaccins CMV

Les manifestations cliniques de l'infection à CMV sont le plus souvent inexistantes dans la population immunisée, souvent moins délétères chez le receveur de greffe d'organe séropositif, et la transmission de la mère au fœtus, médiée par la virémie maternelle et le passage transplacentaire est considérablement diminuée par une immunité préexistante à la grossesse. Ces constats ont favorisé le développement de différents vaccins, d'abord vivants atténués puis inertes contre le CMVH (Figure 47). L'efficacité clinique, bien qu'incomplète, de l'administration d'immunoglobulines hyper-immunes anti-CMV pour diminuer les manifestations cliniques de l'infection périnatale chez le prématuré ou la transmission au fœtus (Nigro et al. 2011), sont également des éléments encourageants. Les deux principales difficultés rencontrées dans le développement des vaccins sont la spécificité d'espèce du virus, mais surtout, le faible nombre d'enfants infectés et symptomatiques, rendant difficile voire impossible, du fait du recrutement nécessaire, les études vaccinales à très grande échelle. Différentes stratégies vaccinales ont été développées *in vivo* notamment dans le but de protéger le fœtus contre l'infection congénitale à CMV. Généralement, les vaccins anti-CMV sont testés chez le cochon d'Inde et le macaque rhésus en raison de leurs similarités anatomiques et embryonnaires avec l'homme.

Une difficulté particulière est le choix des cibles vaccinales. Les glycoprotéines d'enveloppe, gB et gH, notamment, sont les cibles d'une réponse anticorps neutralisante, très présente chez les séropositifs, et lente à apparaître lors de la primo-infection (Crough and Khanna 2009). Ces anticorps anti-gB notamment selon leur maturité, auraient comme nous l'avons vu précédemment un effet facilitant le transport du CMV à travers les syncytiotrophoblastes, ou, lorsque les IgG sont matures, un effet protecteur de barrière (Maidji et al. 2006). La réponse cellulaire est également essentielle pour la maîtrise de l'infection, comme en témoigne le lien entre immunodépression cellulaire et infection à CMV chez les transplantés ou au cours du SIDA. Les cibles des réponses CD4⁺ et CD8⁺ au cours des infections anciennes sont les glycoprotéines d'enveloppe mais surtout la pp65 et les protéines très précoces IE (Gandhi et al. 2003).

a. Vaccins vivants atténués

A partir des années 1990, des vaccins vivants atténués utilisant la souche de CMV Towne, délétée d'une partie de son génome ont été développés (Adler et al. 1998) ; mais l'absence d'immunité durable induite par ces virus l'ont fait abandonner au profit de virus chimères Towne/Toledo (Heineman et al. 2006) permettant d'espérer une meilleure protection. Cependant, la suspicion d'association entre glioblastome et CMV (Michaelis et al. 2009) l'ont fait abandonner au profit de vaccins recombinants utilisant notamment la glycoprotéine d'enveloppe gB indispensable à la pénétration du virus dans la cellule, et cible majeure d'anticorps neutralisants (Crough and Khanna 2009). Ces vaccins recombinants défectifs (virus vaccine, canarypox, alphavax) peuvent être utilisés comme vecteur et portent des fractions protéiques du virus cible (gB ou pp65). Ces vaccins ont l'avantage de ne pas induire de maladie chez le sujet sain ou l'immunodéprimé. L'utilisation du vecteur canarypox et du vaccin exprimant la gB a été testée individuellement ou simultanément chez des patients CMV séronégatifs (Bernstein et al. 2002). Ces traitements expérimentaux préventifs ont montré une activation de la synthèse des anticorps et de la réponse immunitaire cellulaire chez le cochon d'Inde et chez l'homme. En revanche, l'activation de la réponse immune notamment cellulaire est de courte durée. Leurs combinaisons avec un vaccin inerte pourraient améliorer la durée de protection (Plotkin 2001).

b. Vaccins inertes entiers et sous-unitaires

Deux approches ont été développées : les particules virales vides synthétisées en excès par le virus en culture cellulaire, les corps denses ou les protéines recombinantes. Chez la souris, les corps denses, qui contiennent les protéines du virus sans le génome, ont permis d'obtenir une réponse humorale et cellulaire, mais sont complexes à produire à l'échelle industrielle (Pepperl et al. 2000). C'est pourquoi les vaccins ont plutôt été développés avec des protéines recombinantes.

II) Développement de vaccins chez le cochon d'Inde et le macaque rhésus

Comme nous l'avons souligné précédemment, le modèle de transmission congénitale du GPCMV chez le cochon d'Inde, plus accessible que celui du macaque, est un modèle assez proche de l'infection congénitale chez l'homme. La physiopathologie est proche : virémie, mononucléose, splénomégalie, lymphadénopathies, la structure des placentas est identique, la gestation est longue (65-70 jours) divisée en trois périodes, permettant l'étude de la cinétique de transmission. Dans ce modèle, la transmission transplacentaire est de 30 à 50 % en cas de primo-infection, conduisant à une infection congénitale chez les nouveau-nés, avec une mortalité élevée. Dans ce modèle, des tests d'analyse de l'immunité cellulaire et humorale ont été développés (Bia et al. 1984a; Bia et al. 1984b; Schleiss 2008).

L'administration d'anticorps anti-GPCMV chez le cochon d'Inde avant ou juste après l'infection de la mère peut protéger le fœtus de la mort *in utero*. En revanche, lorsque la mère est infectée en fin de 2^{ème} trimestre ou en début de 3^{ème} trimestre de gestation, le virus est capable de traverser le placenta et d'infecter le fœtus (Bernstein et al. 1999). Les femelles gestantes de cochon d'Inde immunisées par du sérum contenant des immunoglobulines anti-gB ont une durée de virémie raccourcie, et sont moins sujettes à des avortements spontanés (Chatterjee et al. 2001).

Parmi les vaccins inertes sous-unitaires, il a été développé chez le cochon d'Inde des pseudo-particules, particules virales inaptées à la réplication du virus, des vaccins à « ADN » et des vaccins « protéiques ».

Les particules pseudo-virales GPCMV (enveloppe soluble partiellement purifiée) protègent contre la mort du fœtus, conduisent à une diminution de l'infection généralisée chez la femelle gestante et le fœtus et à une diminution du nombre de fœtus infectés (Bia et al. 1980; Bia et al. 1984a; Bia et al. 1984b).

Un homologue de la glycoprotéine gB induit une prolifération d'anticorps neutralisants et de lymphocytes. La durée de la virémie de la femelle gestante est réduite et la survie des nouveau-nés est améliorée (Bia et al. 1980; Harrison et al. 1995; Bourne et al. 2001).

Le vaccin « protéique » permet l'administration de la protéine recombinante gB, sécrétée *via* un BAC et purifiée. Il est administré avant la gestation.

Il a été montré d'une part, que ce vaccin a une efficacité contre la mortalité des nouveau-nés (76 % de décès sans vaccination, contre 25 % avec vaccination), et d'autre part, que le choix de l'adjuvant a un impact sur la mortalité (22 % décès avec adjuvant « Freund » contre 47 % avec l'adjuvant « aluminium ») (Schleiss et al. 2004).

Le vaccin à « ADN » permet l'administration de la glycoprotéine virale gB ou de la pp65 par voie intramusculaire *via* un *gene gun* (Schleiss et al. 2000). Seule l'immunisation avec la gB a un impact significatif positif sur la transmission congénitale du GPCMV au début du 3^{ème} trimestre de gestation. En effet, seuls 41 % des nouveau-nés dont la mère a reçu une injection de vaccin sont infectés par le virus (Schleiss et al. 2003).

Chez le macaque rhésus, plusieurs vaccins à virus inactivés ont été développés. Ils permettent la production d'anticorps neutralisant anti-gB, anti-pp65, anti-IE1 (Plotkin 1999; Gonczol and Plotkin 2001; Plotkin 2001).

III) Développement chez l'homme

En 2009, une étude clinique de phase II d'un vaccin recombinant contenant la gB et un adjuvant lipidique, le MF59 a montré des résultats encourageants (Pass 2009; Pass et al. 2009). Dans une cohorte de 464 femmes séronégatives ayant déjà un enfant et donc plus exposées au CMV que la population générale des femmes en âge de procréer ont reçu trois doses vaccinales à 0, 1 et 6 mois *post-partum*. La recherche d'une infection à CMV a été effectuée durant 42 mois (anticorps IgG contre les protéines du CMV) ; la survenue d'une primo-infection à CMV a été confirmée par culture et recherche d'anticorps spécifiques en western blot. Après un suivi minimal de 1 an, 46 infections ont été confirmées, 18 dans le groupe vaccinal et 31 dans le groupe placebo, soit une efficacité vaccinale de 50 %. Les effectifs trop faibles n'ont pas permis de dégager une différence significative concernant le nombre d'enfants infectés dans chaque groupe.

D'autres essais ont été réalisés dans la population des transplantés :

En greffe d'organe, le vaccin gB avec le même adjuvant réduit la fréquence de survenue et la durée de la virémie chez les receveurs séronégatifs vaccinés (Griffiths et al. 2012).

Chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques, un vaccin ADN codant la gB et la pp65 espace les épisodes d'infection à CMV chez les vaccinés durant l'année suivant la greffe, mais ne diminue pas la nécessité de traitement par les antiviraux.

En résumé, chez l'homme, les résultats sont plus contrastés selon les populations et la protection conférée par les différents vaccins reste incomplète. Bien que les anticorps anti-gB semblent partiellement protecteurs contre la transmission materno-fœtale, le vaccin prophylactique anti-CMV reste à améliorer.

Objectifs

Le cytomégalovirus humain est la première cause d'infection congénitale virale dans le monde. Les répercussions de ce virus chez le fœtus et le nouveau-né sont nombreuses et conduisent parfois au décès ou à des handicaps majeurs. Bien que 90 % des infections congénitales ne provoquent pas de symptômes, parmi les 10 % restants, les séquelles sont graves et souvent irréversibles (hépatomégalie, microcéphalie, surdité...). L'infection peut parfois conduire à la mort du fœtus *in utero*.

A l'heure actuelle, la transmission du CMVH de la mère au fœtus n'est pas totalement élucidée. Le placenta agit comme une barrière ou au contraire comme une porte d'entrée pour le virus puisque lors des primo-infections, la transmission au fœtus se produit dans 35 à 40 % des cas (Fowler et al. 1992). C'est ce que souligne ce cas d'une grossesse gémellaire, bichoriale biamniotique au cours de laquelle, malgré la virémie maternelle à 22 semaines post-gestation, seul un des deux fœtus a été infecté. Au cours de la 34^{ème} semaine, le fœtus CMV⁺ décèdera *in utero* avec un fort retard de croissance *in utero* (Lazzarotto et al. 2003).

Les traitements anti-CMV utilisés en prophylaxie ou en curatif sont le valaciclovir, le ganciclovir, le cidofovir et le foscarnet. Ces drogues ne peuvent être utilisées chez la femme enceinte en raison de la toxicité cellulaire qu'elles provoquent.

Différents modèles d'étude d'infection congénitale à CMV ont été développés ces dernières années. Ces modèles permettent de mieux comprendre la physiopathologie de la transmission virale. Cependant les modèles d'étude d'efficacité des antiviraux sur l'infection placentaire et la transmission sont limités par la spécificité d'hôte étroite du virus. Pour cette raison, nous avons souhaité développer deux modèles d'étude *ex vivo* et *in vivo* de la propagation virale dans le placenta humain.

Notre travail s'est organisé en trois axes de recherche. Le premier axe consiste à étudier *in vitro* dans des cultures de fibroblastes embryonnaires humains infectés par le CMVH, l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques ou de leur association. Nous avons choisi deux souches virales, la souche de référence AD169 et un isolat clinique d'infection congénitale P*. Nous avons sélectionné des molécules ayant montré un effet anti-CMVH ou potentiellement actives sur celui-ci et testé l'efficacité antivirale des molécules isolées ou en combinaison, ainsi que leur toxicité. Parmi ces molécules, certaines semblent peu toxiques à faibles concentrations et pourraient être administrées chez la femme enceinte.

Il s'agit du maribavir, un benzimidazole riboside, de deux flavonoïdes, la quercétine et la baïcaléine ainsi que l'antipaludéen, l'artésunate.

Nous avons également sélectionné des kinases agissant sur le cycle cellulaire de la cellule hôte et susceptibles d'interférer avec l'inhibition de pUL97 afin de mieux comprendre l'action du maribavir. Ces anti-Cdks inhibent la croissance cellulaire en inhibant spécifiquement ou non les complexes Cdks/Cyclines qui interviennent à différents stades au cours du cycle cellulaire. Ces complexes permettent la division cellulaire en agissant sur l'entrée des phases G1, S, M et G2.

Le deuxième axe de recherche regroupe les travaux effectués *ex vivo*. Nous avons développé un modèle d'infection placentaire *ex vivo* à CMVH. Notre modèle a l'avantage d'utiliser du placenta humain issu d'interruption volontaire de grossesse (IVG) infecté par des souches humaines de CMV (AD169 et P*). Le développement de ce modèle s'est déroulé en plusieurs étapes successives. Nous avons vérifié la viabilité des explants en culture par une approche originale de détection de la β -HCG, hormone sécrétée dans le surnageant *via* les trophoblastes du placenta. L'infection virale a été observée par immunohistochimie sur des coupes de villosités placentaires et quantifiée par qPCR au cours du temps post-infection. Enfin, nous avons testé l'efficacité et la toxicité de certaines molécules *ex vivo*, telles que le maribavir, l'artésunate et la baïcaléine administrées seules ou en combinaison. Les résultats des études *in vitro* et *ex vivo* sur les molécules utilisables chez la femme enceinte seules ou en combinaison font l'objet d'une publication soumise à Journal of Antimicrobial Chemistry.

Dans le troisième axe de recherche, nous avons développé un modèle d'infection placentaire à CMVH *in vivo* chez la souris immunodéficiente humanisée par un greffon placentaire. Nous avons testé deux conditions d'infections du placenta, soit en infectant directement le placenta greffé ou soit par trempage des villosités dans une suspension de virions avant de les greffer chez la souris. Les souris ont tout d'abord été greffées en sous-cutané au niveau dorsal, puis nous avons amélioré la vascularisation de ces tissus placentaires en greffant ces villosités sous le muscle dorsal. Ces modèles ont permis de tester l'efficacité antivirale du cidofovir, molécule choisie comme témoin car elle ne nécessite pas de phosphorylation *via* des protéines virales.

Approche in vitro

Introduction

Notre travail a consisté à étudier *in vitro*, l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques pouvant inhiber le cytomégalo virus. Les essais antiviraux ont été réalisés sur des fibroblastes embryonnaires humains, cellules permissives pour le CMVH.

Notre étude comprend deux parties. Dans la première partie, nous avons choisi des molécules thérapeutiques nouvelles, peu toxiques pour l'homme, dans le but de traiter l'infection congénitale chez la femme enceinte suite à une primo-infection. Les drogues sélectionnées sont le maribavir, l'artésunate et deux flavonoïdes, la quercétine et la baïcaléine, dont le mécanisme d'action et l'efficacité ont été préalablement étudiés (Cotin et al. 2012). Ces molécules ayant des mécanismes d'action différents, nous avons également étudié leur potentiel antiviral et leur toxicité en combinaison. Ces résultats sont présentés dans la première partie de l'article soumis.

Dans la deuxième partie, nous avons testé l'efficacité de molécules anti-mitotiques, pouvant inhiber l'infection virale à différents stades du cycle cellulaire. En raison de leurs cibles, ces molécules pourraient être utilisées préférentiellement chez des patients immunocompétents présentant des maladies à CMV ou chez des patients immunodéprimés.

Les quatre molécules sélectionnées présentent une activité anti-mitotique dans des lignées cellulaires tumorales (Mgbonyebi et al. 1998). *In situ*, leur action antiproliférative inhibe la croissance de tumeurs (Zarkowska and Mittnacht 1997; Zarkowska et al. 1997; Camidge et al. 2007b; Camidge et al. 2007a).

L'ensemble de ces molécules agit sur les Cdks et les cyclines. Parmi elles, trois inhibent spécifiquement ou indépendamment des complexes Cdks/Cyclines (Cdk4/6/Cycline D ; Cdk2/Cycline E ; Cdk2/Cycline A ; Cdk1/Cycline B) intervenant dans le cycle cellulaire. Une dernière drogue sélectionnée, inhibe l'activité des Cdks 7 et 9, qui jouent un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN.

Dans un premier temps, nous avons testé l'efficacité antivirale de chacune de ces molécules anti-Cdks ; puis dans un deuxième temps, nous avons testé l'efficacité de ces molécules en combinaison avec le maribavir. Le but de cette bithérapie est d'inhiber totalement l'infection virale, en augmentant l'efficacité anti-CMVH du maribavir *via* l'association de deux molécules.

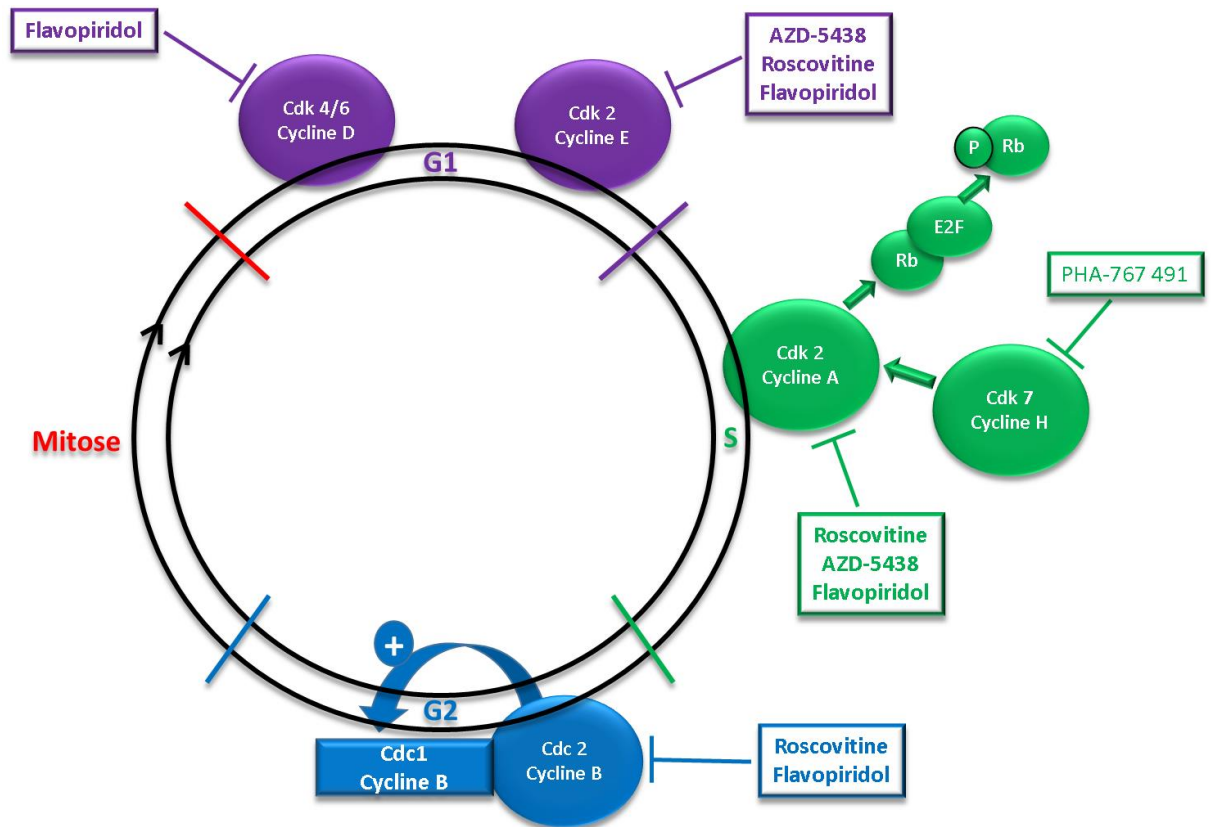


Figure 48 : Implication des complexes Cdks/Cyclines dans le cycle cellulaire et molécules anti-Cdks

La première famille de drogues (anti-Cdks) inhibe la réplication de l'ADN de la cellule hôte par interaction avec des kinases cellulaires, dont certaines sont utilisées par le virus (Cdks 1, 2, 7, 9) (Jault et al. 1995; Bresnahan et al. 1996; Dittmer and Mocarski 1997; Salvant et al. 1998; Sanchez et al. 2003; Sanchez et al. 2004; Tamrakar et al. 2005; Sanchez and Spector 2006; Kapasi and Spector 2008; Rechter et al. 2009) ; et la seconde drogue (maribavir) inhibe la libération des néovirions hors du noyau de la cellule hôte, pour les néovirions n'ayant pas été dégradés indirectement par la 1^{ère} molécule. Le maribavir est une molécule de choix. Elle a un effet anti-CMVH *in vitro* et *in vivo* via l'inhibition de la kinase virale pUL97. Elle présente une bonne biodisponibilité et elle est peu toxique pour les cellules (Wang et al. 2003; Swan et al. 2007). Cependant, chez certains patients, aucune réponse au maribavir n'est obtenue (Avery et al.), (Alain et al., transplantation proceedings in press), et *in vitro* une différence d'inhibition selon le type cellulaire (Chou et al. 2004; Chou 2008) est observée suggérant un impact des enzymes cellulaires sur l'efficacité de la drogue. *In vitro*, l'inhibition de l'action de pUL97 par l'indirubin-3'-monoxime (IMO) montre que les Cdks 1, 2, 5 et 9 pourraient compléter l'inhibition de pUL97 en impliquant les mêmes mécanismes cellulaires (Hertel et al. 2007).

Un renforcement de son effet par inhibition des autres kinases susceptibles de compenser partiellement au moins, l'action de pUL97 pourrait donc être envisagé.

Les molécules anti-Cdks que nous avons choisies sont la roscovitine, le flavopiridol, l'AZD-5438 et le PHA-767 491. Ces drogues induisent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et G2/M (Figure 48).

La roscovitine est un inhibiteur compétitif ATP-dépendant de plusieurs complexes Cdks/Cyclines. Elle inhibe l'activité des Cdks 1, 2, 5, 7 et 9 (Mgbonyebi et al. 1998). Son activité *in vitro* sur le CMV a été montrée. Elle sera la molécule de référence.

Le flavopiridol inhibe les Cdks 1, 2, 4 et 9 et induit l'activité des caspases 3 et 7, conduisant à la mort cellulaire (Patel et al. 1998; Smith et al. 2008).

La molécule AZD-5438 a une action antiproliférative en inhibant les Cdks 1, 2 et 9. Elle inhibe l'activité de l'ARN polymérase II de la cellule en se fixant au domaine C-terminal de celui-ci (Peterlin and Price 2006) et inhibe la phosphorylation de la protéine suppresseur de tumeur pRb (Byth et al. 2009).

La molécule PHA-767 491 est un inhibiteur compétitif des Cdks 7 et 9, conduisant à l'inhibition de la réplication et de la synthèse de l'ADN (Yecies et al.; Montagnoli et al. 2008).

Matériels et méthodes

I) Culture de fibroblastes embryonnaires humains

Les tests de cytotoxicité des drogues et d'efficacité antivirale sont réalisés sur des fibroblastes embryonnaires humains (MRC-5, Biomérieux, Lyon, France). Ces cellules sont mises en culture dans des plaques de 48 puits avec une densité de 5×10^4 cellules par puits dans 500 μ l de milieu de culture « Dulbecco Eagle minimal essential ». Le milieu est complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), préalablement inactivé 30 min à 56°C, et des antibiotiques, pénicilline (1000 UI/ml) et gentamycine (0,01 mg/ml) (Gibco, Life Technologies, Saint Aubin, France) et de l'hépes (12 mM) (Eurobio, Courtaboeuf, France). Avant la confluence cellulaire, les fibroblastes sont incubés pendant 5 jours à 37°C sous 5 % de CO₂.

II) Culture virale

La souche virale de laboratoire AD169, souche de référence du CMVH provient de l'ATCC (VR-538). La souche P* est un isolat clinique provenant d'urines d'un nouveau-né atteint d'infection congénitale. L'obtention d'un stock de virions libres est effectuée par plusieurs passages successifs sur des MRC-5 sur des supports de surface croissante (flacon de 25, 75, 175cm²) pour augmenter le titre viral. Un dernier passage à forte multiplicité d'infection sur un flacon de 175cm² est effectué lorsque l'effet cytopathique atteint 80 % des cellules totales avec incubation 8 à 10 jours, récolte du surnageant, clarification des débris cellulaires par centrifugation à 3000 rotations par minute (rpm) 10 minutes, aliquotage et congélation à -80°C.

Afin de déterminer la multiplicité d'infection au cours des différentes manipulations, le surnageant contenant les virions est titré par immunocytochimie. Cette technique consiste à infecter des MRC-5 en plaque 48 puits avec des dilutions croissantes de virus dans un volume de 500 μ l par puits. Cinq jours après l'infection, les cellules sont fixées à l'acétone (90 %) à -20°C pendant 20 minutes.

Les MRC-5 sont incubés pendant 30 min à 37°C, en présence d'anticorps primaire de souris anti-*Immediate Early Antigen* humain (Argène, Biomérieux, France) préalablement dilué au 25^{ème} dans du PBS sans calcium ni magnésium (Eurobio, Courtaboeuf, France). L'excédent d'anticorps est éliminé par lavages successifs dans du PBS (3 x 5 min). Les MRC-5 sont incubés pendant 30 min à 37°C en présence d'anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (Argène, Biomérieux, France) dilué au 1/100^{ème} dans du PBS. Après 3 lavages successifs dans du PBS, les cellules sont mises en présence de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Dako, Courtaboeuf, France) pendant 2 à 5 min. La liaison de la DAB à l'anticorps secondaire produit une coloration marron. Les noyaux des cellules infectées peuvent ainsi être visualisés au microscope inversé et comptés. On parle de foyers lorsqu'autour d'une cellule initiale infectée dont le cytoplasme et le noyau sont colorés deux cellules secondairement infectées au moins (noyau réniforme coloré) sont visibles. Le nombre de foyers par puits correspond au nombre de particules virales capables de se répliquer (*pfu, plaque forming unit*) et permet de calculer le titre viral du surnageant en pfu par ml de surnageant.

Ceci permet de déterminer la multiplicité d'infection (MOI) utilisée dans les différents essais. Elle correspond au nombre de pfu inoculé divisé par le nombre de cellules à inoculer (100 000 par puits de plaque 48 puits, à confluence).

III) Molécules anti-Cdks

Les anti-Cdks sont dilués dans du DMSO (Sigma, France), aliquotés puis stockés à -80°C à 210,7, 37,3, 200 et 20 mM pour le PHA-767 491, le flavopiridol, la roscovitine et l'AZD-5438 respectivement (Selleck bio, Munich, Allemagne), comme le maribavir (100 mM, Viropharma Incorporated, Exton, USA).

IV) Toxicité cellulaire des composants chimiques

La toxicité cellulaire des drogues est mesurée en utilisant le kit CytoTox96® Non-Radioactive cytotoxicity assay (Promega, Charbonnières, France).

Ce test mesure l'activité de la lactate dehydrogenase (LDH) résiduelle des cellules après incubation avec la molécule à tester.

Le protocole du kit a été suivi avec deux variantes : l'incubation en présence de l'antiviral est allongée de 24 heures à 5 jours pour respecter les conditions de l'essai antiviral et l'hépes, qui génère du bruit de fond est supprimé du milieu de culture. L'activité de la LDH dans le surnageant de culture est mesurée par l'absorbance à 490 nm.

V) Essais antiviraux

Ils sont réalisés sur des cellules MRC-5 confluentes en plaques 48 puits. A confluence, le stock de virus AD169 est inoculé à raison de 500 µl par puits (MOI de 0,001 à 0,002). Au bout de 3 heures, l'inoculum est remplacé par une gamme de concentrations des molécules à tester. Un puits non inoculé sert de témoin de toxicité et reçoit la plus forte concentration de la molécule testée. Un puits inoculé ne reçoit pas d'antiviral et sert de témoin de croissance virale. Les cellules sont incubées à 37°C sous 5 % CO₂ pendant 5 jours. A J5, la révélation des foyers de cellules infectées est effectuée en immunocytochimie selon le même protocole que le titrage viral. La manipulation est effectuée en double et la concentration inhibant 50 % (CI₅₀) et 90 % (CI₉₀) de la croissance virale par rapport au témoin virus sans antiviral est calculée sur une courbe reportant le nombre moyen de pfu par puits en fonction de la concentration en antiviral. Notons que l'isolat clinique P* n'a pas été utilisé pour tester les inhibiteurs de Cdks.

Molécules	CI50	CI90
Roscovitine	12,3 μ M +/- 1,56	Pas atteinte
AZD-5438	4,2 nM	Pas atteinte
Flavopiridol	43,5 nM +/- 9,2	75 nM
PHA-767 491	Indéterminable	Indéterminable
Maribavir	0,41 μ M +/- 0,22	Pas atteinte

Tableau 23a : CI₅₀ et CI₉₀ du maribavir et des anti-Cdks

Molécule 1	Molécule 2
Maribavir 0,5 μ M	Roscovitine 20 μ M
Maribavir 0,5 μ M	AZD-5438 10 nM
Maribavir 10 μ M	Flavopiridol 40 nM

Tableau 23b : CI₉₀ obtenues après association de deux molécules

Tableau 23 : CI₅₀ et CI₉₀ du maribavir et des anti-Cdks administrés seuls ou en combinaison

Résultats

Les résultats concernant les inhibiteurs de Cdks et le maribavir seul sont regroupés dans le tableau 23 (a et b).

I) Toxicité cellulaire des drogues

La toxicité cellulaire des molécules anti-Cdks a été vérifiée *in vitro* sur des fibroblastes embryonnaires humains subconfluents (nappe cellulaire de 24 heures) et confluent (nappe cellulaire de 5 jours). Les cellules subconfluents sont des cellules en division cellulaire plus actives que les cellules confluentes. La subconfluence est plus représentative du développement cellulaire *in situ*. La confluence correspond au stade où les cellules tapissent l'ensemble de la surface disponible. L'arrivée à confluence est caractérisée par un arrêt de la prolifération à cause des signaux transmis par les jonctions cellule/cellule qui produisent une inhibition de contact. La toxicité cellulaire est mesurée dans les cellules à confluence en raison des essais antiviraux qui se déroulent sur 5 jours, temps nécessaire au CMV et plus particulièrement pour les isolats cliniques pour effectuer un cycle répliatif complet.

La toxicité est mesurée en fonction de concentrations croissantes des différentes molécules, utilisées également pour les essais antiviraux (Tableau 24). La roscovitine est peu toxique pour les cellules en croissance lorsque sa concentration est inférieure à 15 μM . Les molécules PHA-767 491 (30 et 50 nM) et AZD-5438 (<100 nM) ne présentent pas de toxicité pour les cellules subconfluents (en croissance) et confluentes (quiescentes). En revanche, le flavopiridol est toxique sur les cellules en croissance, cette toxicité étant beaucoup plus faible voire nulle sur les cellules quiescentes.

Comme attendu, les concentrations en maribavir inférieures à 40 μM ne montrent pas de toxicité pour les fibroblastes, aussi bien pour les cellules subconfluents que confluentes.

Molécules	Concentrations	% mortalité Subconfluence	% mortalité Confluence
Roscovitine (μM)	5	0	0
	10	0	0
	40	2,3	22,64
	80	16,84	26,11
	100	34,5	36,94
Flavopiridol (nM)	60	22,84	0
	80	27,91	2,12
AZD-5438 (nM)	10	0	0
	20	0	0
	60	0	2,5
	100	0	7,38
	200	16,91	29,53
PHA-767 491 (nM)	30	0	0
	50	0,91	0
Maribavir (μM)	0,5	0	0
	1	0	0
	5	0	0
	20	0	0
	40	0	11,62

Tableau 24 : Pourcentage de mortalité cellulaire après traitements pharmacologiques

II) Efficacité antivirale des anti-Cdks

L'efficacité antivirale des drogues est évaluée à une multiplicité d'infection de 0,001 à 0,002 sur la souche de référence AD169 (80 à 200 pfu par puits).

a. Roscovitine

Nous avons utilisé des concentrations allant de 1 à 100 μM . L'augmentation de la concentration en roscovitine conduit à une réduction du nombre de foyers infectieux à CMV dans les cellules en culture. La CI_{50} est de 12,3 μM +/- 1,56 (Figure 49 a et b). L'infection est totalement inhibée par la roscovitine à partir de 40 μM (CI_{90}) à une MOI de 0,002.

b. AZD-5438

La molécule AZD-5438 réduit l'infection CMVH dans les fibroblastes à partir de 5 nM, soit des concentrations 1000 fois inférieures à celles observées pour la roscovitine (Figure 50 a). A cette multiplicité d'infection, la concentration de 5 nM est suffisante pour inhiber l'infection virale d'environ 55 % ($\text{CI}_{50} = 4,2$ nM). Notons que la concentration de 20 nM a une forte activité antivirale : elle réduit de 70 % le nombre de foyers infectieux (Figure 50 b) mais que la CI_{90} n'est pas atteinte.

c. Flavopiridol

Le flavopiridol inhibe la réplication du CMVH à partir de 20 nM. La CI_{50} de cette molécule est de 43,5 nM +/- 9,2 et la CI_{90} est de 75 nM. L'infection virale est totalement inhibée à 80 nM. Comme les molécules précédentes, la molécule est plus efficace contre le virus lorsque la multiplicité d'infection est faible (Figure 51 a et b).

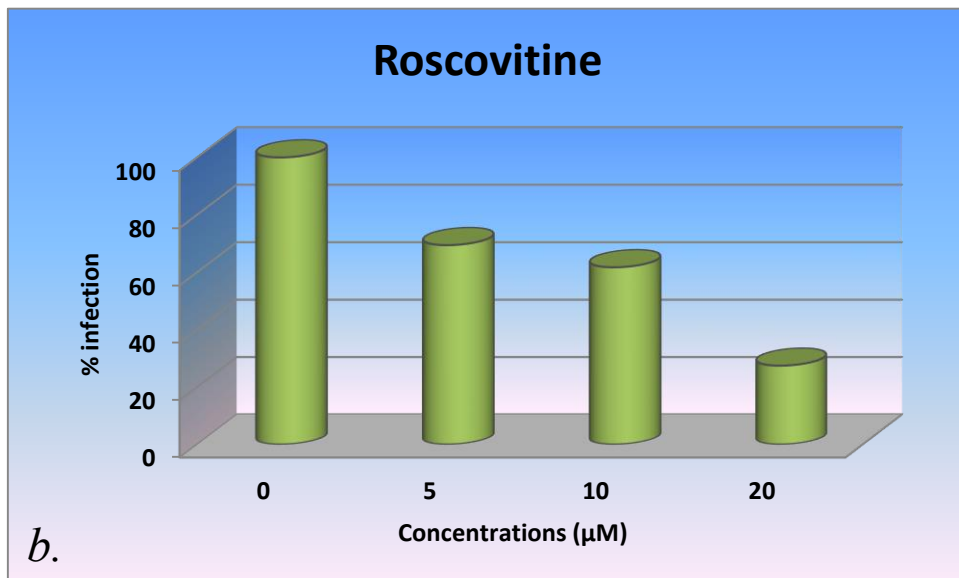
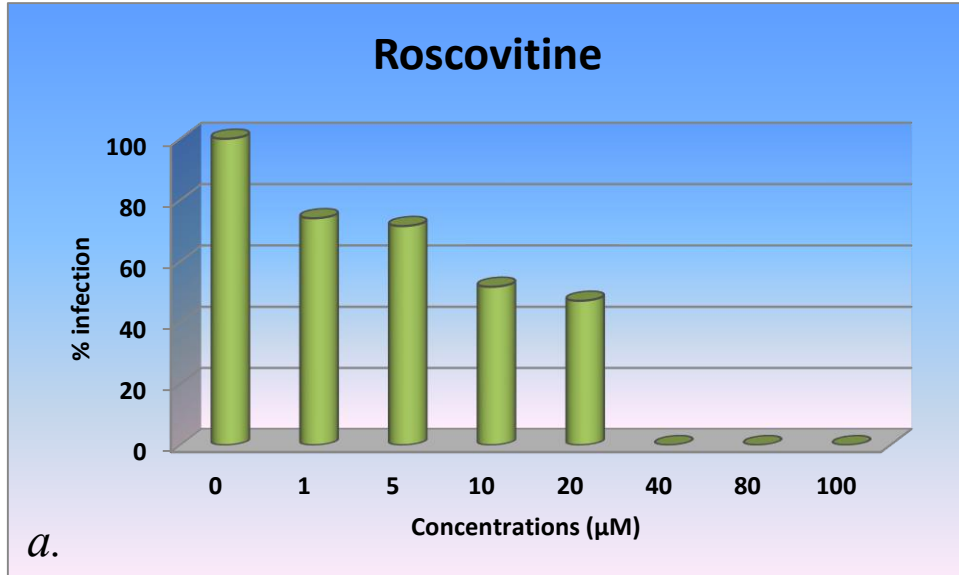


Figure 49 : Efficacité anti-CMVH de la Roscovitine
 MOI = 0.002 (a), 0.001 (b)

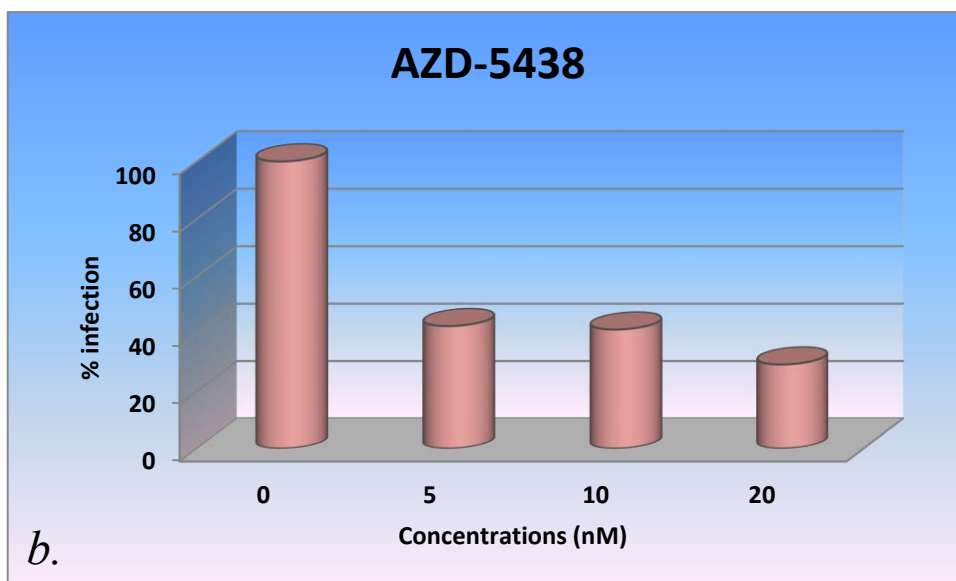
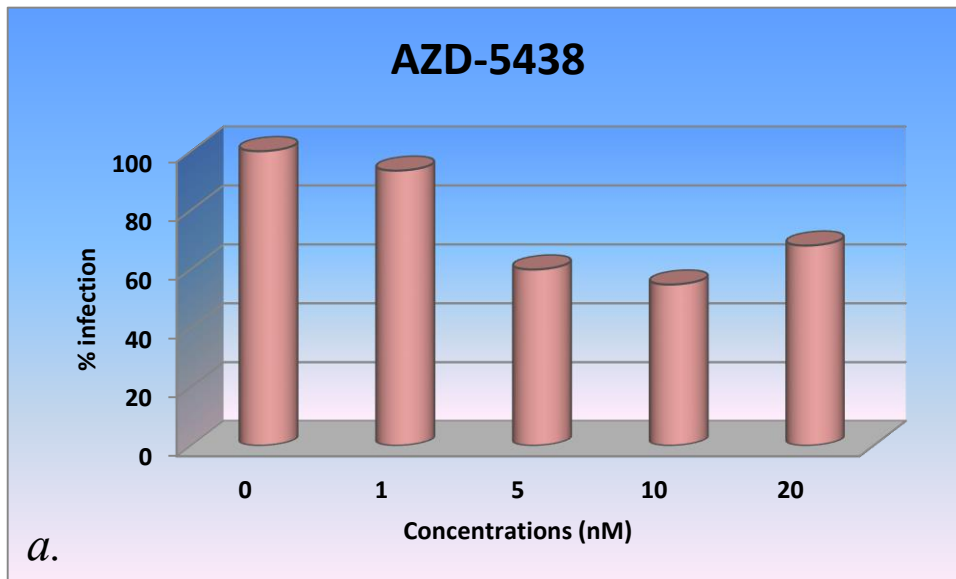


Figure 50 : Efficacité anti-CMVH de l'AZD-5438
 MOI = 0.002 (a), 0.001 (b)

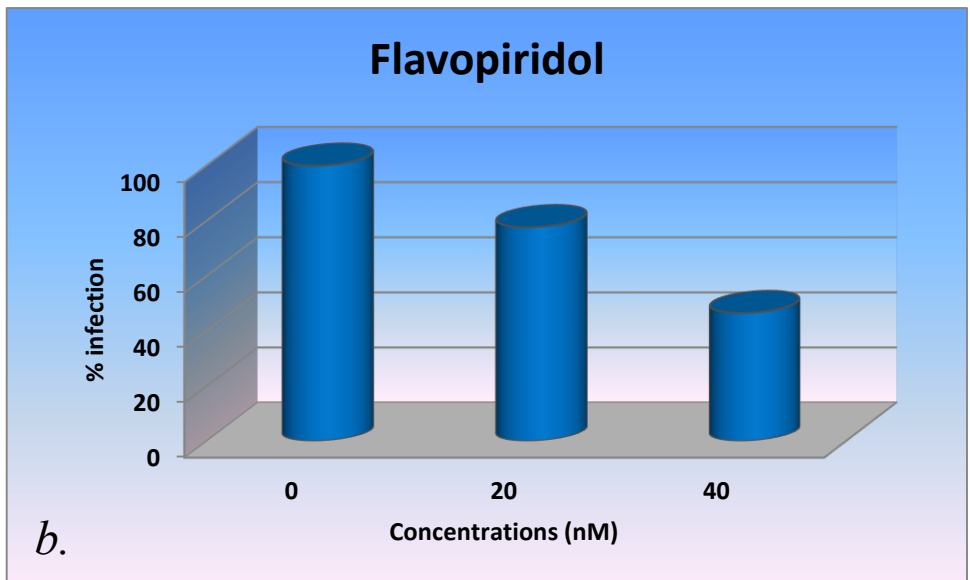
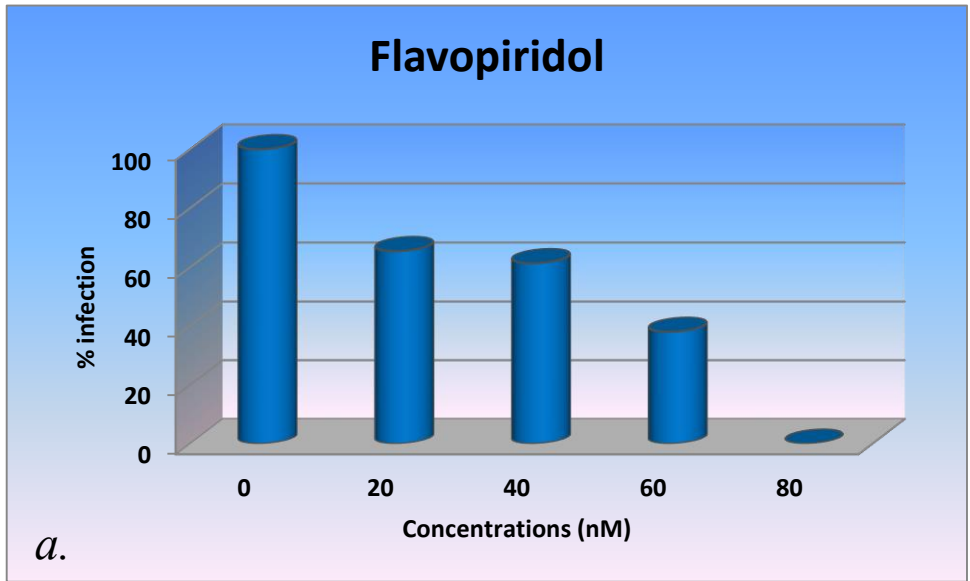


Figure 51 : Efficacité anti-CMVH du Flavopiridol
 MOI = 0.002 (a), 0.001 (b)

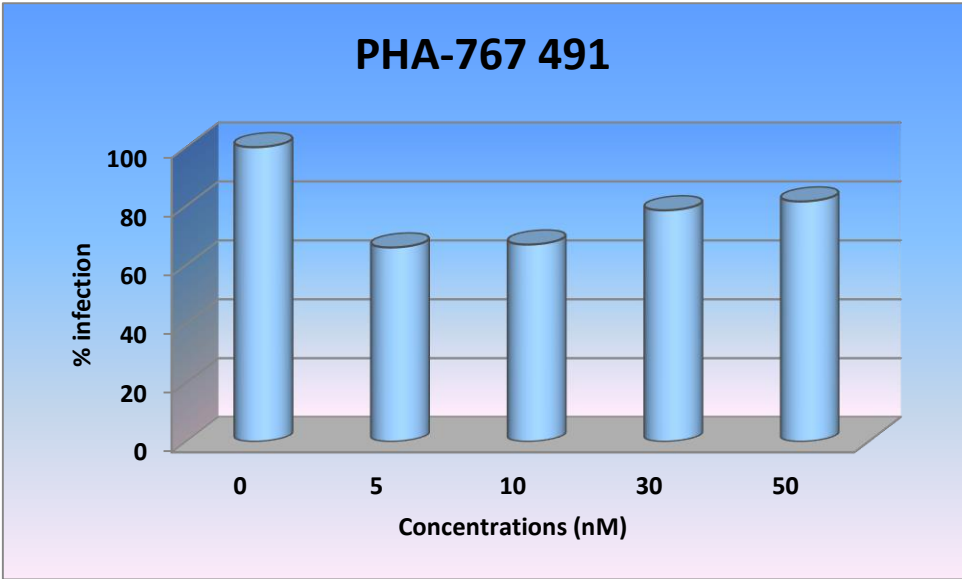
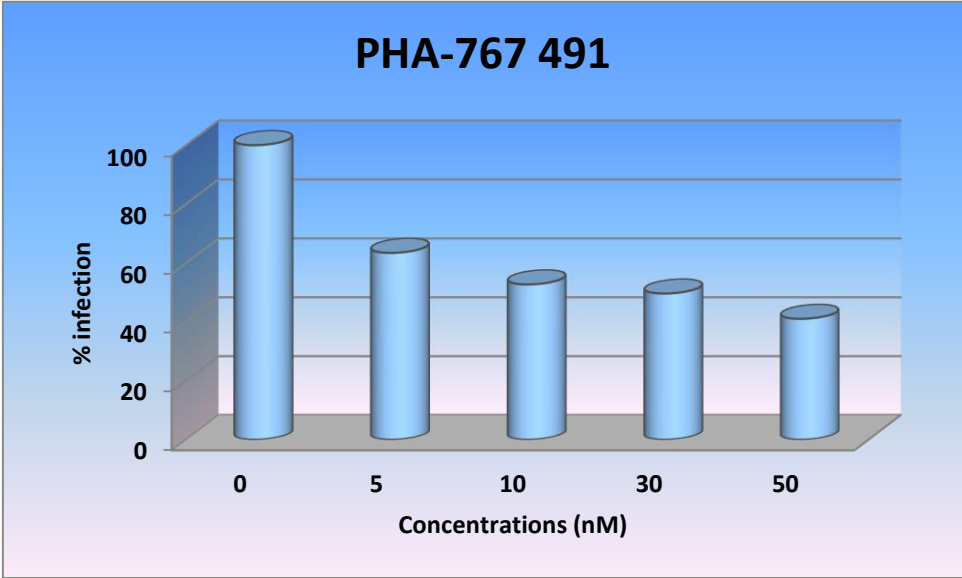


Figure 52 : Efficacité anti-CMVH du PHA-767 491
MOI = 0.002 (a), 0.001 (b)

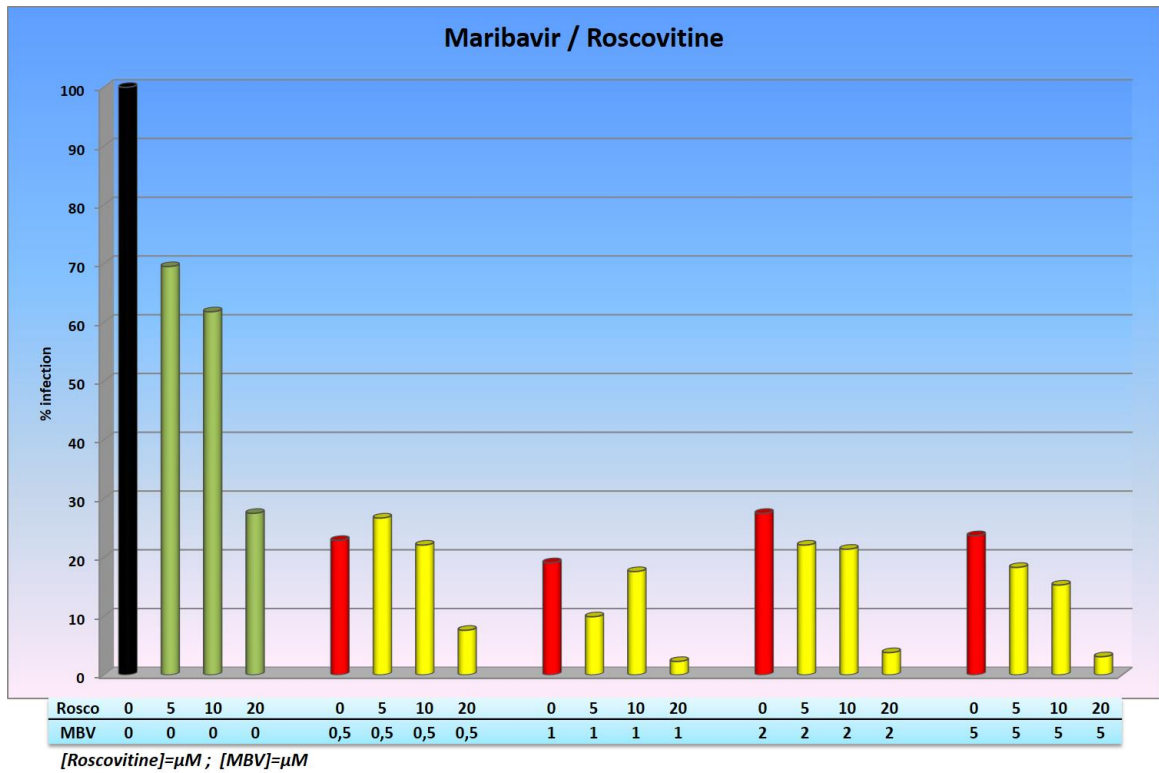


Figure 53 : Efficacité anti-CMVH de l'association MBV/Roscovitine
 MOI = 0.001

d. PHA-767 491

La molécule PHA-767 491 présente une efficacité antivirale inconstante (Figure 52 a et b). Les essais antiviraux ne sont pas reproductibles. En effet, l'augmentation croissante de cette molécule conduit soit à une réduction de l'infection, soit au contraire, à une augmentation de l'infection. Ces résultats laissent supposer que cette molécule ne parvient pas à se stabiliser au cours du temps dans le milieu de culture. Ceci justifierait un travail préalable sur la stabilité de la molécule pour mieux en étudier l'efficacité.

III) Efficacité antivirale des bithérapies Maribavir/anti-Cdks

Quelle que soit leur efficacité isolément, nous avons testé ces molécules en combinaison avec le maribavir pour rechercher un effet additif ou synergique par inhibition des kinases cellulaires. Pour mettre cet effet en évidence, nous avons utilisé des concentrations des deux molécules équivalentes ou inférieures à la CI_{50} .

Le maribavir seul a une forte efficacité antivirale. Il réduit d'environ 70 % l'infection dès la concentration de 0,5 μM . En revanche, la CI_{90} n'est pas atteinte aux concentrations testées (Figure 53).

a. Maribavir/Roscovitine

Le principal effet observé est celui du maribavir car la première concentration testée s'avère supérieure à la CI_{50} dans cet essai (CI_{50} (MBV) = 0,41 μM +/- 0,22). L'ajout de la roscovitine n'améliore pas l'inhibition de l'infection ou très légèrement, aux concentrations de roscovitine de 5 ou 10 μM (Figure 53).

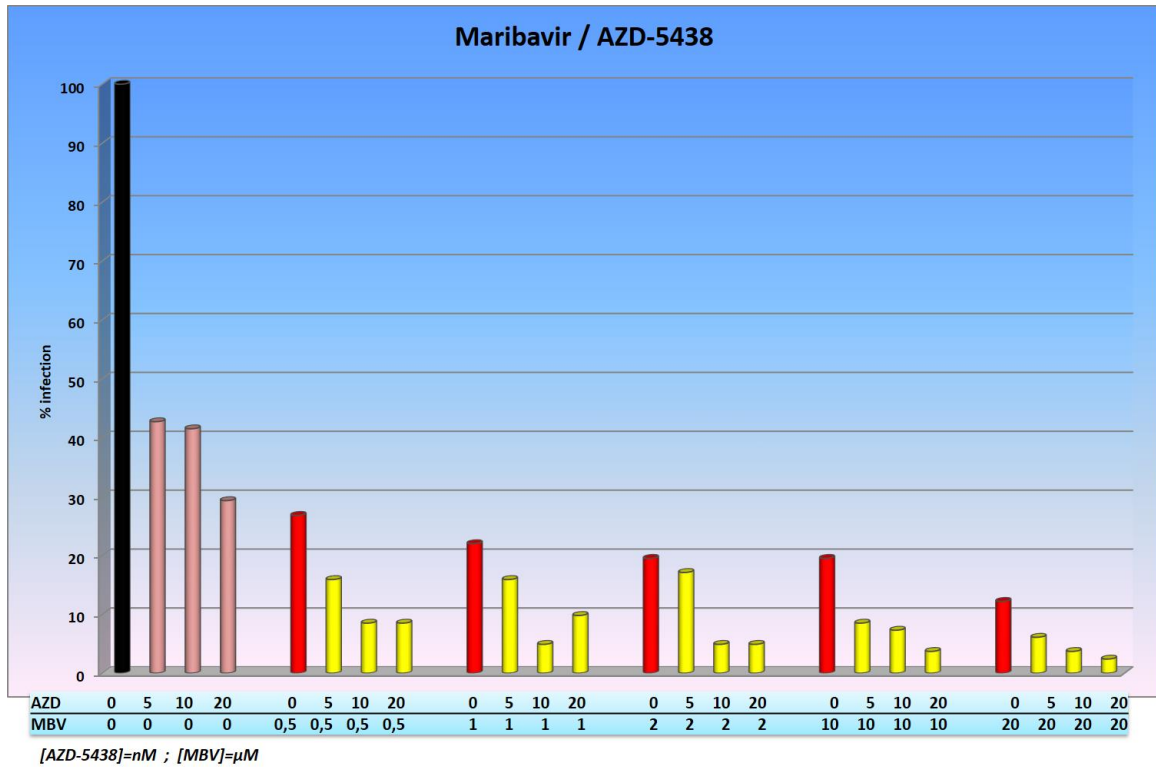


Figure 54 : Efficacité anti-CMVH de l'association MBV/AZD-5438
 MOI = 0.001

En revanche, la multiplication virale est fortement réduite par l'ajout de 20 μM (CI_{50} roscovitine = 15 μM) de roscovitine aux différentes concentrations de MBV. L'association des deux molécules présente donc un effet additif mais non synergique.

L'inhibition est de 92,4 % pour la combinaison des deux molécules, comparé à 77,1 % pour le maribavir seul (0,5 μM) et 72,5 % pour la roscovitine (20 μM) seule. La meilleure association observée est roscovitine 20 μM / maribavir 1 μM (97,7 % d'inhibition).

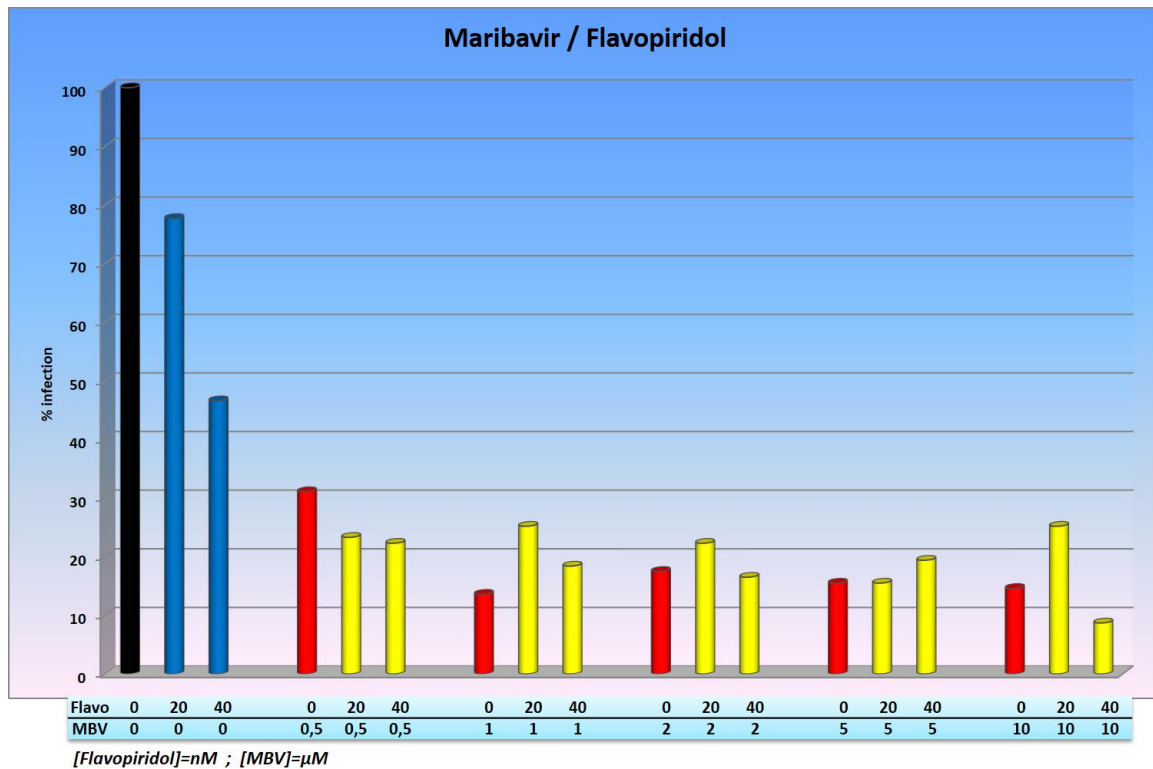
b. Maribavir/AZD-5438 (Figure 54)

La bithérapie maribavir/AZD-5438 améliore l'efficacité de l'AZD-5438 mais pas la CI_{50} du maribavir. En revanche, elle permet d'atteindre la CI_{90} : 90,5 % d'inhibition pour la bithérapie, contre 58,5 % pour l'AZD-5438 (10 nM) seul et 73,2 % pour le maribavir (0,5 μM). Plus les concentrations des deux molécules augmentent et plus l'inhibition est observée. L'inhibition de la croissance virale est quasi-totale à 20 μM de maribavir / 20 nM d'AZD-5438 (97,6 %). On observe donc une synergie dans l'activité antivirale de ces deux molécules.

c. Maribavir/Flavopiridol

L'association du maribavir (0,5 μM) avec le flavopiridol (20 nM) réduit de 6,9 % la croissance virale par rapport à l'efficacité du maribavir seul : 69,9 % d'infection pour le maribavir contre 76,7 % pour son association (Figure 55) et de plus de 50 % par rapport au flavopiridol seul. On observe donc un apparent effet additif à cette concentration.

Etonnamment, l'augmentation des concentrations des deux molécules conduit à une légère diminution de l'inhibition de la croissance virale par rapport à l'efficacité du maribavir seul. Ces résultats laissent supposer un effet antagoniste des deux molécules lorsque celles-ci sont en excès et suggèrent l'action sur une même molécule cible. Cette combinaison thérapeutique ne représente donc pas un traitement de choix contre l'infection virale à CMVH.



**Figure 55 : Efficacité anti-CMVH de l'association
MBV/Flavopiridol**
MOI = 0.001

Conclusion

Ces résultats confirment la capacité de certains inhibiteurs de kinases cellulaires à interférer avec la croissance du virus, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire pour l'AZD-5438 et le flavopiridol. Ces effets avaient déjà été observés pour la roscovitine ainsi que pour d'autres inhibiteurs de kinases agissant sur des cibles différentes de celles de UL97 (le sirolimus, inhibiteur de la voie mTOR, molécule de mécanisme d'action proche de l'artésunate (Chou et al., en 2006). La synergie, plus prononcée dans les fibroblastes épithéliaux, dans lesquels le MBV était moins actif, était en faveur d'un mécanisme compensatoire de l'inhibition ces mécanismes cellulaires d'UL97 *via* les kinases cellulaires. Cette synergie, curieusement, n'était pas retrouvée sur un mutant résistant au maribavir alors que les inhibiteurs de kinase, pris isolément, étaient inhibiteurs. Des effets antagonistes avec le léflunomide, inhibiteur tardif du cycle viral avaient également été décrits. Nous avons voulu préciser ces données en choisissant des inhibiteurs de Cdks touchant les mêmes voies d'action que la kinase UL97, en conservant comme référence la roscovitine. Faute de disposer de fibroblastes épithéliaux, nous avons travaillé dans des fibroblastes embryonnaires humains de poumon fœtal MRC-5.

Bien qu'il n'ait pas été possible, en raison de la faible quantité d'inhibiteurs disponibles, de répéter et compléter ces résultats, un effet additif est retrouvé comme attendu d'après les travaux de Hertel et al. et de Chou et al. avec la roscovitine, ce qui valide nos résultats (Hertel et al. 2007). L'effet synergique potentiellement observé avec l'AZD-5438 et qui permet une inhibition quasi complète de la croissance virale est intéressant. En effet l'AZD-5438, outre le blocage des Cdks inhibe directement la phosphorylation de la protéine suppresseur de tumeur pRb et bloque l'action de l'ARN polymérase II en se fixant à son extrémité C-terminale. Elle inhibe donc directement deux mécanismes activés par UL97 au profit du virus, ajoutant son action directe sur les substrats à l'inhibition de UL97 par le maribavir, d'où la synergie possible.

Le flavopiridol donne des résultats discordants qui peuvent être liés à sa toxicité à la CI_{90} sur les cellules, qui perturbe les résultats en inhibant le métabolisme cellulaire (les cellules infectées voient leur métabolisme augmenté et leur apoptose bloquée et la toxicité du flavopiridol peut se rapprocher de celle des cellules en croissance). Ceci est cohérent avec son mécanisme d'action qui induit l'activité des caspases 3 et 7, conduisant à la mort cellulaire. Ceci permet d'expliquer un effet additif ou une synergie. Toutefois cela ne permet pas d'expliquer l'apparent antagonisme à forte dose. Dans tous les cas, la toxicité potentielle et le mécanisme d'action de cette molécule font limiter son usage aux expériences *in vitro*.

L'ensemble des résultats *in vitro* est en faveur d'un effet compensatoire de l'inhibition d'UL97 par certaines des Cdks cellulaires. L'addition d'un inhibiteur de Cdks serait donc une piste thérapeutique et l'activité potentiellement synergique de l'AZD-5438 est encourageante.

Publication

Partie introductive

Notre travail a consisté à développer un modèle d'infection *ex vivo* permettant l'étude de l'infection virale CMVH dans les villosités flottantes de placentas et l'étude de l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques administrées seules ou en combinaison (maribavir, baicaléine, quercétine et artésunate). L'efficacité antivirale de ces molécules a été vérifiée préalablement *in vitro*.

Dans cette première publication, l'objectif principal était de rechercher les meilleures combinaisons (les plus efficaces et les moins toxiques) à partir d'antiviraux utilisés en pratique clinique comme l'artésunate et le maribavir. Nous souhaitons également poursuivre nos travaux sur les flavonoïdes (Cotin et al. 2012) pour explorer leur potentiel en combinaison avec les anti-polymérase et les inhibiteurs tardifs, puisque ces molécules agissent sur les étapes précoces ou très précoces du cycle viral. Nous avons aussi voulu explorer les possibilités d'association avec l'artésunate, autre inhibiteur des étapes très précoces. Le travail *in vitro* est un prérequis aux essais *ex vivo*, indispensables pour évaluer l'efficacité des antiviraux au sein d'un tissu, composé par nature de cellules différentes. Ce point est particulièrement important pour le maribavir, drogue dont l'efficacité peut varier, *in vitro*, d'un type de fibroblaste à l'autre (Chou et al. 2006).

Nous avons choisi de placer cette publication après les travaux *in vitro* sur les inhibiteurs de Cdks car elle fait le lien entre les essais *in vitro* et les essais sur modèle de tissu *ex vivo*.

Conclusion

Le développement du modèle d'infection *ex vivo* a permis d'étudier la cinétique de l'infection de deux souches humaines de CMVH, la souche de référence AD169 et une souche clinique congénitale P*. L'infection des villosités flottantes de placentas de 1^{er} trimestre de grossesse a été observée au cours du temps post-infection. Les cellules placentaires permissives au virus ont été déterminées par immunohistochimie. Ce modèle conforte la voie de transmission du virus de la mère au fœtus proposée par Maidji et al. (Maidji et al. 2006). Le virus présent dans le sang maternel traverse les couches cellulaires de syncytiotrophoblastes puis de cytotrophoblastes, avant d'atteindre les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins situées à l'intérieur du mésenchyme embryonnaire. Ces cellules transmettraient ensuite le virus jusqu'au fœtus *via* la veine ombilicale.

Le modèle *ex vivo* a permis l'étude de l'efficacité de nouveaux antiviraux utilisés seuls ou en combinaison, préalablement testés *in vitro*. L'artésunate, le maribavir, la baïcaléine et la quercétine ont montré un fort potentiel antiviral contre les souches virales CMVH.

Approche ex vivo

Introduction

Le but de notre travail est de développer des modèles d'infection du placenta à cytomégalo virus *ex vivo* et *in vivo*. Ces modèles ont pour but d'une part, de mieux comprendre la transmission transplacentaire du virus et d'autres parts, de tester de nouvelles molécules thérapeutiques visant à inhiber la réplication virale. Le développement de ces modèles a consisté à se rapprocher de l'infection congénitale *in situ*, via l'utilisation de tissus placentaires humains infectés par des souches virales humaines.

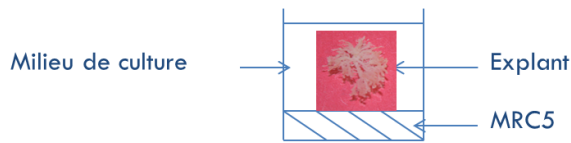
Notre modèle *ex vivo* repose sur l'infection de placentas humains de premier trimestre de grossesse, issus d'interruptions volontaires de grossesses, avec des souches virales de CMVH. Nous avons utilisé la souche de référence AD169, ainsi qu'une souche clinique isolée de l'urine d'un bébé séropositif au CMV, nommée P*. Le principe de notre modèle est d'infecter une matrice de fibroblastes embryonnaires humains, cellules permissives au virus, permettant la propagation des virions, présents dans le surnageant de culture, jusqu'au placenta. Nous avons choisi comme cible les villosités flottantes du placenta. Ces villosités fœtales baignent dans le sang maternel et pourraient être à l'origine de la transmission du virus au fœtus via les leucocytes maternels CMVH⁺. Afin de mimer cette propagation virale par capillarité, nous avons ajouté à notre modèle *ex vivo* une éponge, permettant de séparer la matrice de fibroblastes des explants placentaires. L'avantage de cette séparation est d'éliminer toute contamination virale par contact de cellule à cellule.

Le développement du modèle d'infection placentaire *ex vivo* s'est déroulé en trois étapes.

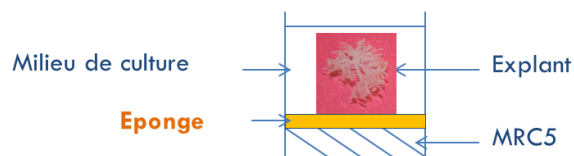
Dans un premier temps, nous avons vérifié la viabilité des explants des villosités placentaires par dosage de β -HCG. *In situ*, cette hormone est fortement sécrétée par les syncytiotrophoblastes lors des premières semaines de la grossesse. En clinique, son dosage permet de déterminer si une femme est enceinte. Ici, le dosage de cette hormone permet de déterminer si les cellules placentaires mises en culture sont suffisamment viables pour en excréter.

Dans un deuxième temps, nous avons observé dans les explants, la cinétique de l'infection avec deux souches virales de CMVH, la souche AD169 et la souche clinique P*. Cette souche congénitale est un avantage pour notre modèle.

Modèle d'infection ex vivo sans éponge



Modèle d'infection ex vivo avec éponge



J0 : Infection MRC5 pendant 4 jours (AD169 ou P*)

J4 : Dépôt des explants de villosités flottantes sur éponges ou non

Viabilité des explants :

J6, 9, 15, 21 : Récupération du surnageant et des explants

Cinétique d'infection à AD169 :

J8, 12, 16, 20 : Récupération des explants pour quantifier les charges virales

Cinétique d'infection à P* :

J10, 13, 19, 25 : Récupération des explants pour quantifier les charges virales

Figure 64 : Modèles d'infection à CMVH ex vivo



Figure 65 : Photographie de villosités flottantes de placenta de 1^{er} trimestre de grossesse

Les effets physiopathologiques de l'infection des villosités placentaires par la souche P* sont davantage similaires à ceux d'une infection *in utero* par une souche de laboratoire.

Dans ces deux premières parties développées ci-dessous, la viabilité des explants placentaires et la cinétique d'infection des souches AD169 et P* sont comparées entre les modèles avec éponge et sans éponge.

Puis, nous avons testé l'efficacité de molécules thérapeutiques pouvant inhiber l'infection congénitale *ex vivo*. Dans le but de pouvoir traiter une primo-infection chez la femme enceinte, nous avons testé plusieurs drogues. Les molécules choisies ont pour cibles la protéine virale pUL97 ou la voie NFκB. Son inhibition conduit à l'arrêt du cycle cellulaire de la cellule hôte, et empêchant ainsi le virus de se répliquer. Ses molécules ont l'avantage d'être peu ou pas toxique pour les cellules. Ainsi, nous avons testé *ex vivo*, le maribavir, la baïcaléine et l'artésunate, administrés seuls ou en combinaison. Notons que l'artésunate, molécule utilisée contre la malaria peut être administrée chez la femme enceinte lors de paludisme sévère. Cette partie « thérapeutique » est présentée dans la publication soumise, nous ne détaillerons donc ici que l'optimisation du modèle.

La technique de flottaison utilisant les éponges est décrite dans la publication. Nous avons cependant schématisé les étapes de la réalisation des modèles *ex vivo* (Figures 64, 65).

L'éponge Spongostan dental™ (NewPharma, Liège, Bruxelles) est une éponge de gélatine porcine, non résorbable et insoluble dans l'eau. Elle est généralement utilisée à des fins thérapeutiques antihémorragiques. Elle est découpée stérilement en cubes de 5 mm de côté sur lesquels sont déposés les explants qui sont mis à flotter sur le surnageant de culture (1 explant par éponge).

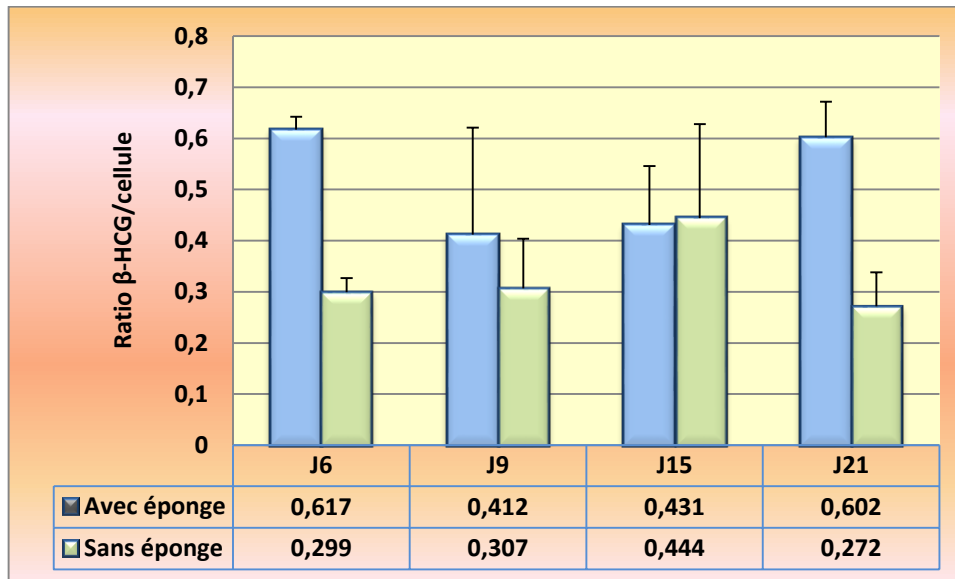


Figure 66 : Viabilité cellulaire des explants en présence ou en absence d'éponges

Résultats

I) Comparaison de la viabilité des explants avec ou sans éponge

Avant d'étudier l'infection à CMVH dans le placenta, nous avons vérifié la viabilité des villosités mises en culture, au cours du temps, par dosage de β -HCG en électrochemiluminescence.

Le dosage exprimé en mUI/ml est réalisé dans le surnageant de milieu de culture dans lequel baignent les villosités à différents temps post-dépôt des explants en culture. Sachant que les villosités n'ont pas toutes la même taille, nous avons normalisé les résultats des dosages en fonction du nombre de cellules présentes dans chaque explant. La quantité de cellules est déterminée suite à l'extraction de l'ADN, par qPCR albumine. On compte deux copies du gène codant l'albumine par cellule. Le ratio de viabilité est donc déterminé par le ratio de dosage de β -HCG (mUI/ml) divisé par la quantité de copies d'albumine divisée par deux.

Le ratio est calculé à J6, J9, J15 et J21 dans les deux modèles *ex vivo*, en présence ou en absence d'éponge (Figure 66). Dans les deux cas, le ratio est compris entre 0,2 et 0,7, signifiant qu'un syncytiotrophoblaste excrète 0,2 à 0,7 mUI/ml de β -HCG. Le ratio pour chaque modèle reste assez constant dans le temps : le modèle avec éponge présente un ratio compris entre 0,4 et 0,6 de J6 à J21 ; et le modèle sans éponge présente un ratio compris entre 0,25 et 0,45, suggérant une viabilité constante des explants mis en culture. A J9 et J15 post-dépôt des explants, le ratio « en présence d'éponge » est similaire à celui sans éponge. En revanche, à J6 et J21, les syncytiotrophoblastes du modèle avec éponges excrètent deux fois plus de β -HCG que dans le modèle sans éponge.

Ces résultats démontrent d'une part que les explants de villosités flottantes mis en culture restent viables au cours du temps ; et d'autres parts, que la présence de l'éponge dans le modèle favorise la viabilité cellulaire.

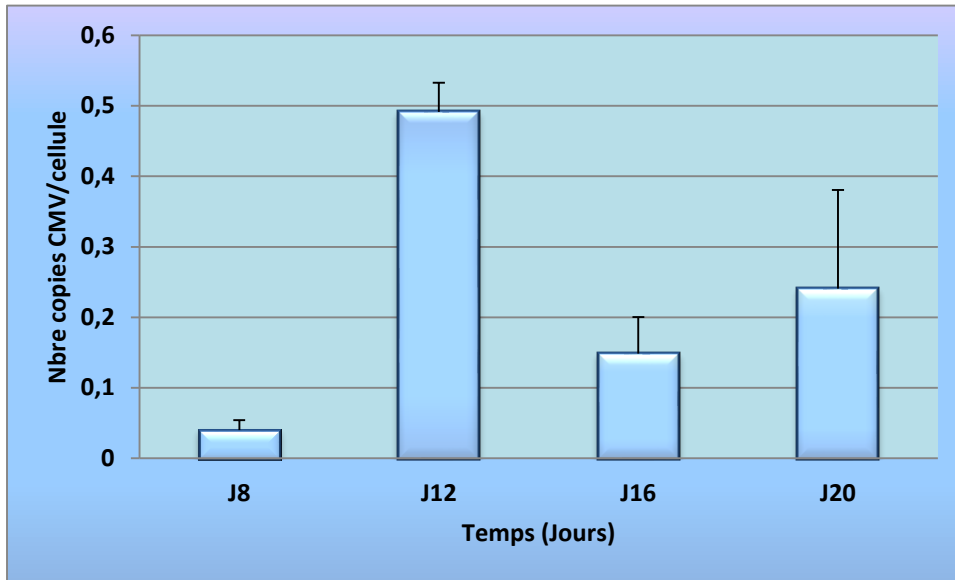


Figure 67 : Cinétique de l'infection AD169 dans les explants en présence d'éponges

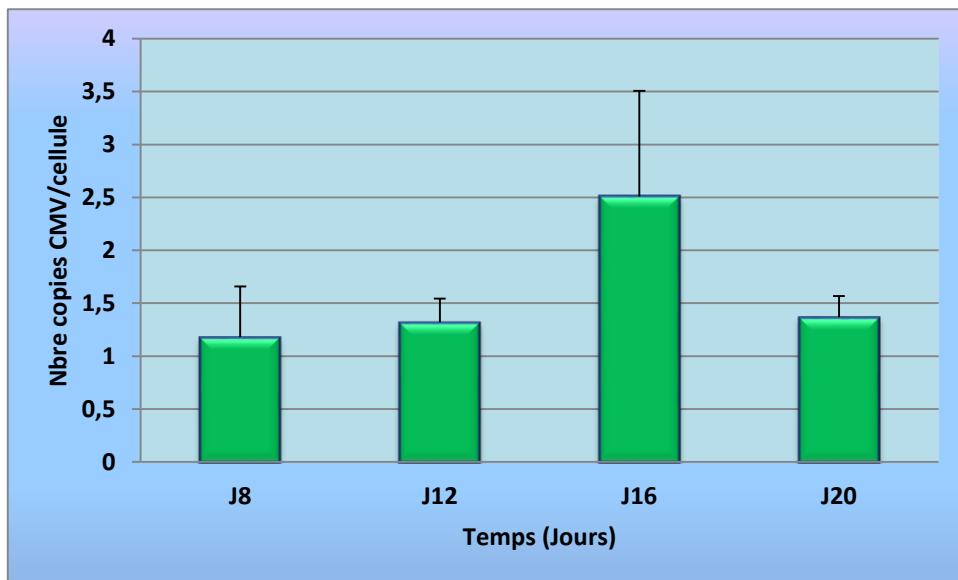


Figure 68 : Cinétique de l'infection AD169 dans les explants en absence d'éponges

II) Comparaison de la cinétique d'infection à CMVH avec ou sans éponge

a. Infection avec la souche de référence AD169

Nous avons évalué la cinétique d'infection du CMVH dans les explants mis en culture. La charge virale est déterminée par qPCR UL83 (Mengelle et al. 2003) ou pp65. La quantité de copies d'UL83 est normalisée par qPCR albumine. La charge virale exprimée en copies de CMV/cellule est déterminée par le ratio de copies d'UL83 présentes dans chaque explant divisée par le nombre de copies d'albumine divisé par 2.

Nous avons analysé la cinétique d'infection de la souche AD169 à une même multiplicité d'infection de 0,5 entre les modèles éponge et sans éponge.

En présence d'éponge, l'infection virale augmente fortement de J8 à J12 où elle atteint un pic à environ 0,5 copie de CMV par cellule (Figure 67). Ensuite, l'infection diminue à J16 puis ré-augmente légèrement. Ces résultats laissent supposer qu'un « cycle » de réplication dans l'explant dure environ 12 jours. A J12, le premier cycle est terminé et débute un deuxième cycle, laissant prévoir un pic de l'infection à J24.

Dans le modèle *ex vivo* sans éponge, la cinétique d'infection semble plus longue que celle du modèle éponge, avec un pic de la charge virale à J16 (Figure 68). Nous supposons qu'un deuxième cycle de réplication pourrait débiter à J32. Lorsque l'on compare les charges virales entre ces deux modèles, on remarque que les villosités placentaires sont plus infectées par la souche AD169 en absence d'éponge. A J8, on compte environ 30 fois plus de copies de CMV/cellule en absence d'éponge.

Ces résultats suggèrent d'une part que le CMV est capable de se répliquer au cours du temps dans les villosités placentaires en culture, et d'autre part, que le virus se réplique davantage dans le modèle sans éponge. Cette observation s'explique par le fait que le modèle sans éponge augmente le risque de transmission du virus par contact entre les fibroblastes infectés et les trophoblastes des explants.

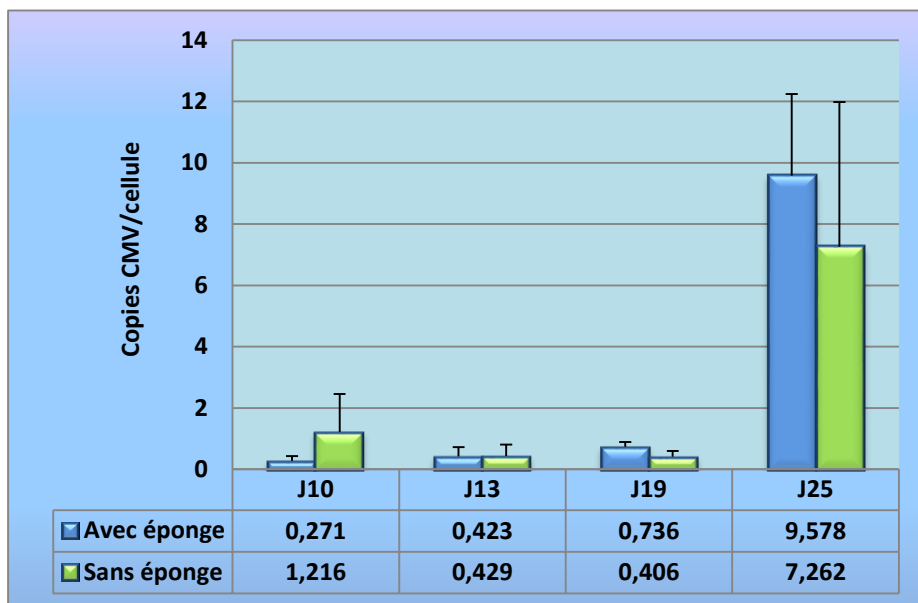


Figure 69: Cinétique de l'infection P* dans les explants en présence ou en absence d'éponges

b. Infection avec la souche clinique P*

Nous avons mesuré l'infection virale de la souche clinique de nouveau-né P* dans les explants *ex vivo*. Les deux modèles avec ou sans éponge sont comparés. L'expérience a été effectuée à partir d'un même placenta avec une même souche virale (440 000 pfu/ml).

L'infection à P* est croissante au cours du temps de J10 à J25, avec un pic de la charge virale à J25, en présence d'éponges (Figure 69). En revanche, la cinétique d'infection sans éponge diminue de J10 à J19 avant d'obtenir un pic à J25. Remarquons que l'écart type de la charge virale à J10 est important. La charge virale pourrait être d'environ 0,4 copie de CMV/cellule à J10 et augmentait ensuite au cours du temps jusqu'à J25, suggérant un seul cycle de réplication du virus.

Conclusion

Le modèle *ex vivo* d'infection placentaire développé au cours de cette thèse a montré d'une part que les souches virales humaines AD169 et P* sont capables de se répliquer au cours du temps dans les villosités flottantes, et d'autre part, que la présence de l'éponge dans le milieu de culture favorise la viabilité des tissus placentaires ainsi que la réplication virale.

Les villosités flottantes du placenta ayant un rôle primordial dans la transmission du virus de la mère au fœtus, notre modèle présente un avantage majeur dans l'étude de l'infection placentaire. Ainsi ce modèle permet l'étude du potentiel thérapeutique de molécules seules ou en association. Les traitements qui seraient capables d'inhiber l'infection virale dans le placenta, pourraient inhiber l'infection congénitale à CMVH. Le problème majeur dans le traitement de l'infection congénitale lors d'une primo-infection étant l'utilisation de molécules non toxiques pour le fœtus, l'analyse de la toxicité cellulaire des molécules au sein des tissus cibles est également un avantage de notre modèle.

Approche in vivo



Introduction

Le développement de modèles d'étude d'infection à CMVH a connu une émergence depuis ces dernières années. Ces modèles ont pour but de mimer l'infection virale dans différents types cellulaires et de tester l'efficacité anti-CMV d'antiviraux, d'anticorps neutralisants ou de vaccins.

L'infection à CMV *in vivo* a été testée chez différentes espèces animales, la souris, le rat, le cochon d'Inde, ou le macaque rhésus. Ces espèces animales sont choisies en fonction des similitudes avec l'humain dans plusieurs critères notamment, l'anatomie, la physiologie, la défense de l'organisme, l'embryogenèse. Cependant aucune espèce ne peut être infectée par le CMVH.

A l'heure actuelle, l'infection congénitale à CMV a été étudiée dans des modèles de cochon d'Inde et de macaque rhésus infectés respectivement par les souches virales GPCMV et RhCMV. Ces modèles apportent des éléments de réponse sur la fréquence de transmission du virus de la femelle au fœtus en fonction du stade de gestation, ainsi que sur la physiopathologie de l'infection et l'efficacité des thérapeutiques sur les CMV animaux. En revanche, ces modèles s'éloignent légèrement de l'infection congénitale *in situ* en l'absence de tissus humains et de virus humains.

Nous avons développé un modèle d'infection placentaire chez la souris. Ce modèle consiste à greffer des villosités flottantes de placentas humains issus d'interruption volontaire de grossesse à des souris porteuses d'un déficit immunitaire combiné sévère afin d'éviter le rejet de la xéno greffe, qui sont ainsi humanisées. Ces greffons peuvent donc être infectés par du CMVH, et l'efficacité des antiviraux mesurée *in vivo*. Les premiers modèles de ce type utilisaient des fragments de thymus greffés sous la capsule rénale ou en intra-oculaire. Nous avons choisi de greffer dans des sites plus accessibles sous-cutané ou musculaire, avec un tissu nouveau, le placenta. Il était donc nécessaire de valider dans cette variante la vascularisation du greffon et l'infection virale.

Notre modèle s'est développé en plusieurs étapes. Dans un premier temps, nous avons comparé deux techniques permettant l'infection des villosités placentaires, par injection « intra-greffon » ou par « trempage » des villosités. Les tissus placentaires ont été greffés au niveau dorsal en sous-cutané. Dans ce modèle, la viabilité des greffons est analysée au cours du temps post-greffe à l'aide d'un marqueur de prolifération cellulaire, Ki67.

La cinétique de l'infection virale est observée par immunohistochimie et quantifiée par qPCR albumine/CMV dans les tissus placentaires humains. L'efficacité antivirale du cidofovir a été vérifiée chez ces souris.

Dans un deuxième temps, nous avons développé un modèle d'infection placentaire en greffant les tissus sous le muscle dorsal des souris. Ce modèle « sous-musculaire » a pour but d'améliorer la vascularisation des greffons afin d'étudier l'efficacité de molécules administrées par voie orale. Nous avons validé la vascularisation par une approche innovante : les souris greffées sont gavées *per os* par un acide aminé de synthèse, la norleucine. Elle est ensuite détectée dans le sang et les tissus greffés par une technique d'HPLC.

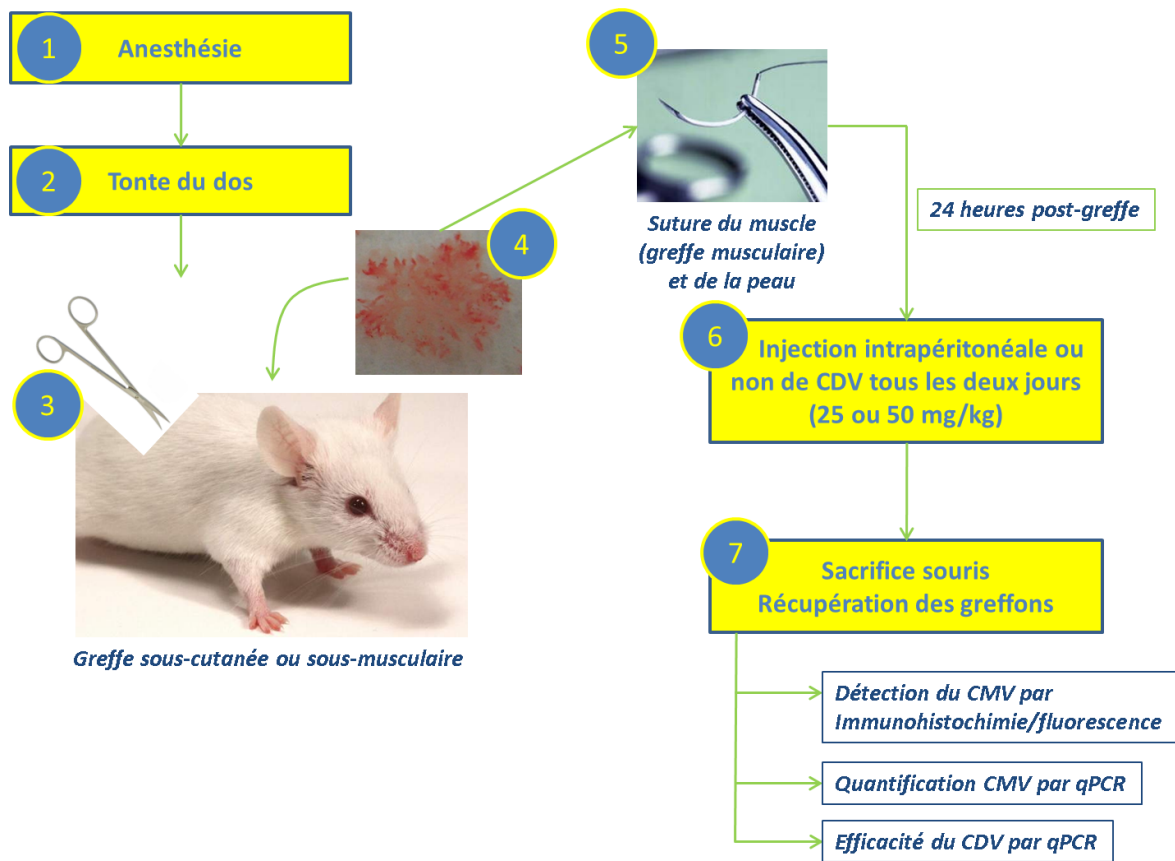


Figure 70 : Modèles d'infection CMVH « sous-cutané » et « sous-musculaire » chez la souris SCID

Matériels et méthodes

I) Greffe des villosités flottantes placentaires chez la souris SCID

a. Souris

Les souris immunodéficientes SCID sont âgées de 6 à 8 semaines et pèsent 15 à 25 g (Charles River, Toulouse, France). Elles sont utilisées afin d'éviter tout rejet de la xéno greffe. La reproduction et l'élevage de la lignée sont effectués au sein de l'animalerie EOPS (« pathogen free ») de la Faculté de Médecine de Limoges, sous la direction de Sylvie Desforges.

II) Greffe des souris en sous-cutané ou sous-musculaire (Figure 70).

Les souris sont anesthésiées avec un mélange de xylozine/kétamine par voie intrapéritonéale (100 mg/kg kétamine ; 15 mg/kg de xylozine), puis tondues au niveau dorsal. Pour les souris greffées en sous-cutané, une incision de la peau est effectuée à l'aide de ciseaux afin d'insérer en sous-cutané l'explant de placenta humain. La plaie est refermée par un ou deux points chirurgicaux à l'aide de fil de suture résorbable (Vicryl 4.0, 19 mm, Ethicon, Issy les Moulineaux, France).

Pour les souris greffées en sous-musculaire, une incision longitudinale à la colonne vertébrale est effectuée dans le muscle dorsal. L'explant de placenta est mis dans le muscle, puis celui-ci est suturé avec du fil chirurgical ainsi que la plaie de la peau (Figure 71). Afin d'éviter une infection, de la bétadine 10 % est appliquée sur la plaie. Les souris sont traitées avec une dose prophylactique d'amoxicilline (100 mg/kg souris) par voie intrapéritonéale. Afin d'éviter une hypothermie, les souris sont recouvertes de papier absorbant.

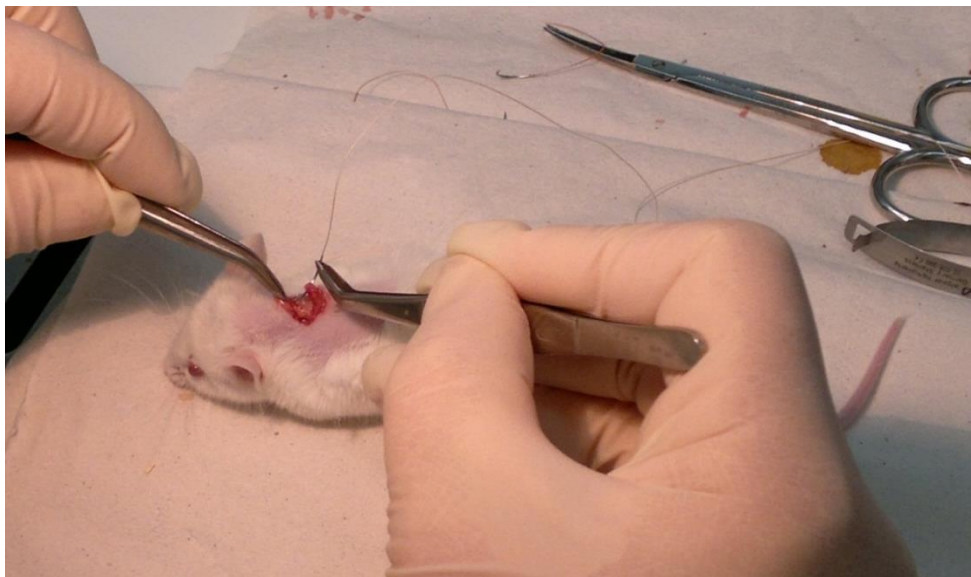
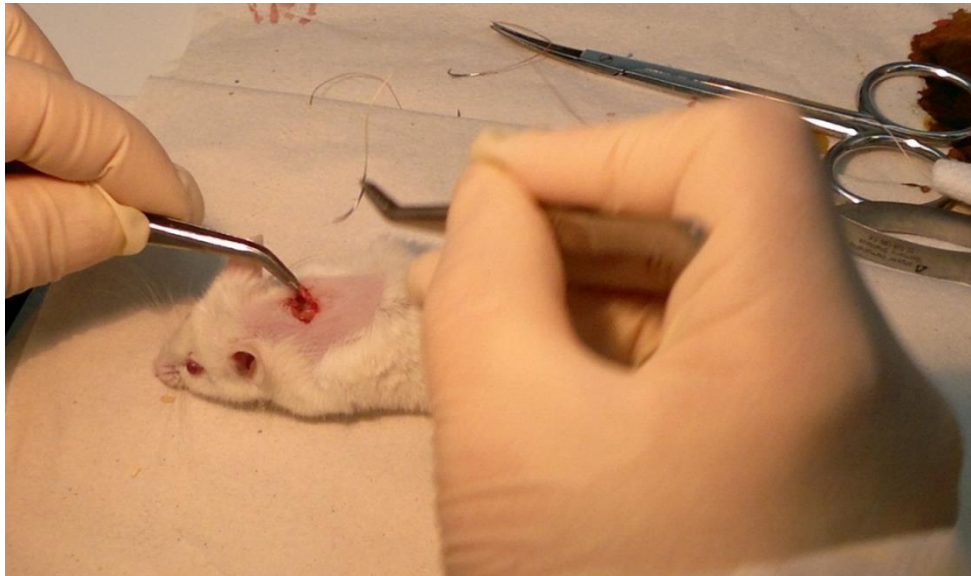


Figure 71 : Suture de la peau chez la souris SCID

III) Infection des villosités flottantes

a. 1^{ère} technique : par injection

Les souris greffées reçoivent une injection de CMVH (50 µl de virions libres à 200 pfu de la souche virale AD169 « Titan », souche exprimant la protéine Green Fluorescent Protein au niveau de la capsid) ou de milieu de culture pour les souris contrôle, directement dans le greffon à travers la peau 6 jours post-greffe.

- Nombre de greffon par souris : 1
- Nombre de souris par condition : 3 souris CMV⁺/condition + 1 souris CMV négative/condition

b. 2^{ème} technique : par trempage

Les villosités flottantes isolées du placenta, sont infectées par trempage dans un bain de surnageant de virions (souche AD169 titan à 200 pfu/ml) à 37°C sous 5 % de CO₂ pendant 24 heures. Après l'infection, les explants sont greffés dans les souris en sous-cutané.

- Nombre de greffon par souris : 2
- Nombre de souris par condition : 2 souris CMV⁺/condition + 1 souris CMV négative/condition.

IV) Récupération des greffons

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Une incision de la peau est réalisée afin d'en extraire le greffon. Il est plongé dans du formol 10 % pour les études immunohistochimiques en paraffine ou immédiatement congelé à - 80°C pour les analyses d'immunofluorescence et de charges virales.

Marqueurs	Sites d'action	Espèces	Dilutions	Fournisseurs
CK7	Trophoblastes (syncytiotrophoblastes et cytotrophoblastes)	Rabbit polyclonal	1/100 ^{ème}	Abcam
B-HCG	Trophoblastes (syncytiotrophoblastes et cytotrophoblastes)	Rabbit polyclonal	1/100 ^{ème}	Abcam
Ki67	Noyaux (marqueur de prolifération cellulaire)	Mouse polyclonal	1/50 ^{ème}	Santa Cruz
CD31	Vaisseaux sanguins	Mouse monoclonal	1/50 ^{ème}	Dako
I.E.A CMV	Gène très précoce du CMV	Mouse polyclonal	1/25 ^{ème}	Argene
Secondaire DyLight 405		Goat anti- rabbit	1/200 ^{ème}	ThermoScientific
Secondaire DyLight 405		Goat anti- mouse	1/200 ^{ème}	ThermoScientific
Secondaire DyLight 594		Goat anti- rabbit	1/200 ^{ème}	ThermoScientific
Secondaire DyLight 594		Goat anti- mouse	1/200 ^{ème}	ThermoScientific

Tableau 27 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunohistochimie et immunofluorescence

V) Traitement des souris SCID

Vingt-quatre heures après l'infection des greffons par trempage, les souris greffées sont traitées tous les deux jours avec 25 ou 50 mg/kg de Cidofovir par voie intrapéritonéale.

VI) Immunohistochimie sur coupes en paraffine

Les greffons sont récupérés chez les souris et fixés dans 10 % de formol. 24 heures après la fixation, les greffons sont inclus en paraffine.

Des coupes sériées de 4 µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un microtome puis déposées sur des lames Superfrost Plus (Thermoscientific, Villebon sur Yvette, France). Elles sont incubées une nuit à 56°C ou deux jours à 37°C avant de réaliser les marquages immunohistochimiques.

Les lames sont plongées dans 2 bains successifs de toluène (2 x 5 min) pour déparaffiner, puis dans deux bains d'alcool (1 min dans éthanol pur, puis 1 min dans éthanol 70 °). Les lames sont ensuite rincées dans de l'eau stérile puis dans du PBS (2 x 2 min) (BioMérieux, Craponne, France).

Les lames sont incubées dans du tampon citrate 0,01 M (pH = 7) 3 x 5 min au micro-onde. Cette étape de démasquage antigénique permet d'améliorer l'accessibilité des anticorps aux antigènes, en rompant les liaisons moléculaires créées par le formol et modifiant la configuration spatiale des épitopes. Les lames sont refroidies pendant 40 min avant de bloquer les peroxydases endogènes dans un bain de PBS - 1 % BSA 1h à température ambiante (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Après avoir entouré les coupes fixées de stylo hydrophobe, les lames sont incubées en présence de l'anticorps primaire (Tableau 27), en chambre humide pendant 1 nuit à 4°C (anticorps dilué dans PBS - 1 % BSA). Le lendemain, les lames sont incubées dans du PBS - 1 % BSA pendant 30 min puis dans de l'eau oxygénée 3 % (H₂O₂) en eau distillée pendant 20 min.



**Figure 72 : Photographie d'un greffon de villosités
flottantes de placenta, récupéré 21 jours post-greffe
chez la souris**

Cette étape permet de perméabiliser les membranes cellulaires. Avant l'incubation avec l'anticorps secondaire, les lames sont rincées dans du PBS - 1 % BSA pendant 2 min. L'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase est incubé 2 heures dans une chambre humide à l'obscurité. Les lames sont lavées 40 min par bains successifs (4 bains et 10 min) dans du PBS, puis incubées en présence d'une solution de DAB (Dako, Courtaboeuf, France) 15 min à température ambiante. Après lavage rapide à l'eau distillée, les lames sont incubées dans un bain d'alcool à 70° 1 min, un bain d'alcool à 96° 1 min puis deux bains de toluène (2 x 5 min) et sont montées avec une goutte de baume du Canada (VWR, Fontenay-sous-bois, France).

Les protocoles d'immunofluorescence sur coupes congelées et de qPCR Albumine/CMV sont identiques à ceux utilisés pour l'analyse des explants dans le modèle ex vivo et sont décrits dans la publication soumise.

VII) Test de vascularisation des greffons

a. Validation de la vascularisation des greffons après greffe sous-cutanée

Dans cette première version du modèle, la vascularisation des greffons a été validée par l'observation macroscopique d'une néo-vascularisation à J21 (Figure 72) et confirmée par les tests d'inhibition antivirale après injection de cidofovir. Indirectement, la fonctionnalité du greffon a également été validée par les résultats de survie des greffons, par la présence de marqueurs de prolifération et d'infection virale par immunohistochimie. Un taux très faible d'infection virale dans un greffon peut en effet être le reflet d'un fort taux de mortalité dans les cellules infectées ne permettant pas la réplication virale.

Cette validation est faite à chaque manipulation, en introduisant dans les séries un témoin greffon non infecté et dans les séries avec antiviral, un témoin greffon infecté sans antiviral et en examinant macroscopiquement les greffons lors de leur récupération. En immunohistochimie, il est possible d'identifier les cellules portant des marqueurs de prolifération (*voir le paragraphe « anatomie du greffon » dans la partie résultats*).



Figure 73 : Administration per os de Norleucine chez la souris SCID

b. Validation de la vascularisation des greffons après greffe musculaire

i. Détermination de la concentration de norleucine à administrer et temps nécessaire à cette molécule pour parcourir la circulation sanguine

La norleucine est un acide aminé de synthèse absente chez les êtres vivants. La norleucine est couramment utilisée en clinique comme témoin positif pour l'analyse d'échantillons de patients par HPLC (Sykam Chromatography, S433, Eresing, Allemagne). L'HPLC ou chromatographie en phase liquide permet la séparation d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

Ici, nous avons utilisé la norleucine (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) administrée *per os* par gavage chez des souris dans le but d'être détectée dans le greffon, suggérant la vascularisation des greffons de placentas (Figure 73).

La concentration en norleucine détectable dans le greffon ainsi que le temps nécessaire à cette molécule pour se propager du système digestif, au foie, puis aux autres organes *via* la circulation sanguine ont d'abord été déterminés.

❖ 1^{er} test

Huit souris SCID non greffées sont gavées *per os* avec différentes concentrations de norleucine : 5, 10, 20 ou 40 mM dans un volume de 200 µl d'huile d'olive (2 souris/concentration en norleucine) (Figure 74). Après 3h30, le sang de chaque souris est récupéré *via* le sinus orbital (environ 800 µl). Il est déprotéinisé avec de l'acide sulfosalicylique (1/5) puis centrifugé pendant 10 min à 4000 rpm à 4°C. Le surnageant est stocké à - 20°C avant l'analyse par HPLC.

❖ 2^{ème} test

Six souris sont gavées avec 300 ou 600 mM de norleucine *per os*. Le sang est récupéré à 4h et 6h post-gavage (Figure 74).

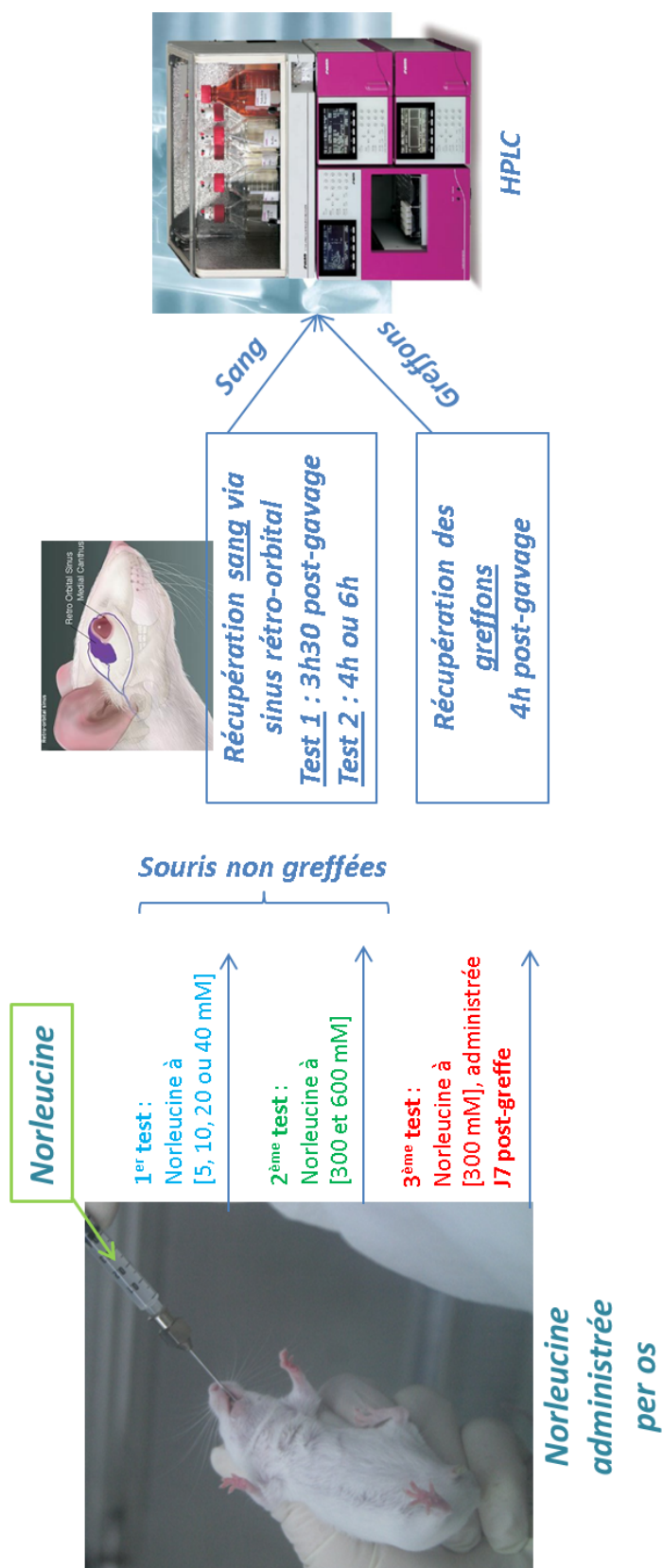


Figure 74 : Tests de validation de la vascularisation des greffons

❖ 3^{ème} test

Quatre souris SCID sont greffées en sous-musculaire avec des villosités flottantes de placentas (Figure 74). Sept jours post-greffe, trois souris sont gavées avec 300 mM de norleucine. Une souris ne reçoit pas de norleucine. Elle sera utilisée comme contrôle. Quatre heures plus tard, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les greffons sont retirés du muscle dorsal et broyés dans 1,2 ml de sérum physiologique dans un mortier posé sur de la glace. 800 µl du broyat sont ajoutés à 200 µl d'acide sulfosalicylique. Le mélange déprotéinisé est centrifugé 10 min à 4000 rpm à 4°C. Le surnageant est stocké à - 20°C avant l'analyse HPLC.

ii. Détection de la norleucine par HPLC

L'analyse HPLC a été effectuée dans le laboratoire de biochimie du CHU de Limoges, sous la direction de Thierry Chianéa (Praticien Hospitalier) et de Yoanne Mousseau (Assistant Praticien Hospitalier).

Les surnageants sont décongelés puis recentrifugés pendant 3 min à 3000 rpm. Les protéines (100 µl) sont incubées 30 min à 4°C dans de l'acide sulfosalicylique (50 µl) puis centrifugées 10 min à 3000 rpm.

Les protéines sont déposées dans des microtubes en présence de solution contrôle (100 µl 1-méthyl histidine à 1 mM, 100 µl 3-méthyl histidine à 1 mM, 9,8 ml solution tampon D). L'ajout du 1 et 3-méthyl-histidine dans l'échantillon permet de vérifier du bon fonctionnement de la détection d'HPLC. En effet, si ces deux acides aminés sont détectés dans l'échantillon, la manipulation d'HPLC est validée. Les microviales sont déposées dans l'analyseur (S433, Sykam, Eresing, Allemagne) pour l'analyse des acides aminés contenus dans les échantillons de sang ou de greffons. Les échantillons sont analysés en comparaison avec une solution standard qui comporte un panel d'acides aminés (Sykam).

Les résultats sont analysés sur ordinateur *via* le logiciel fourni (Sykam).

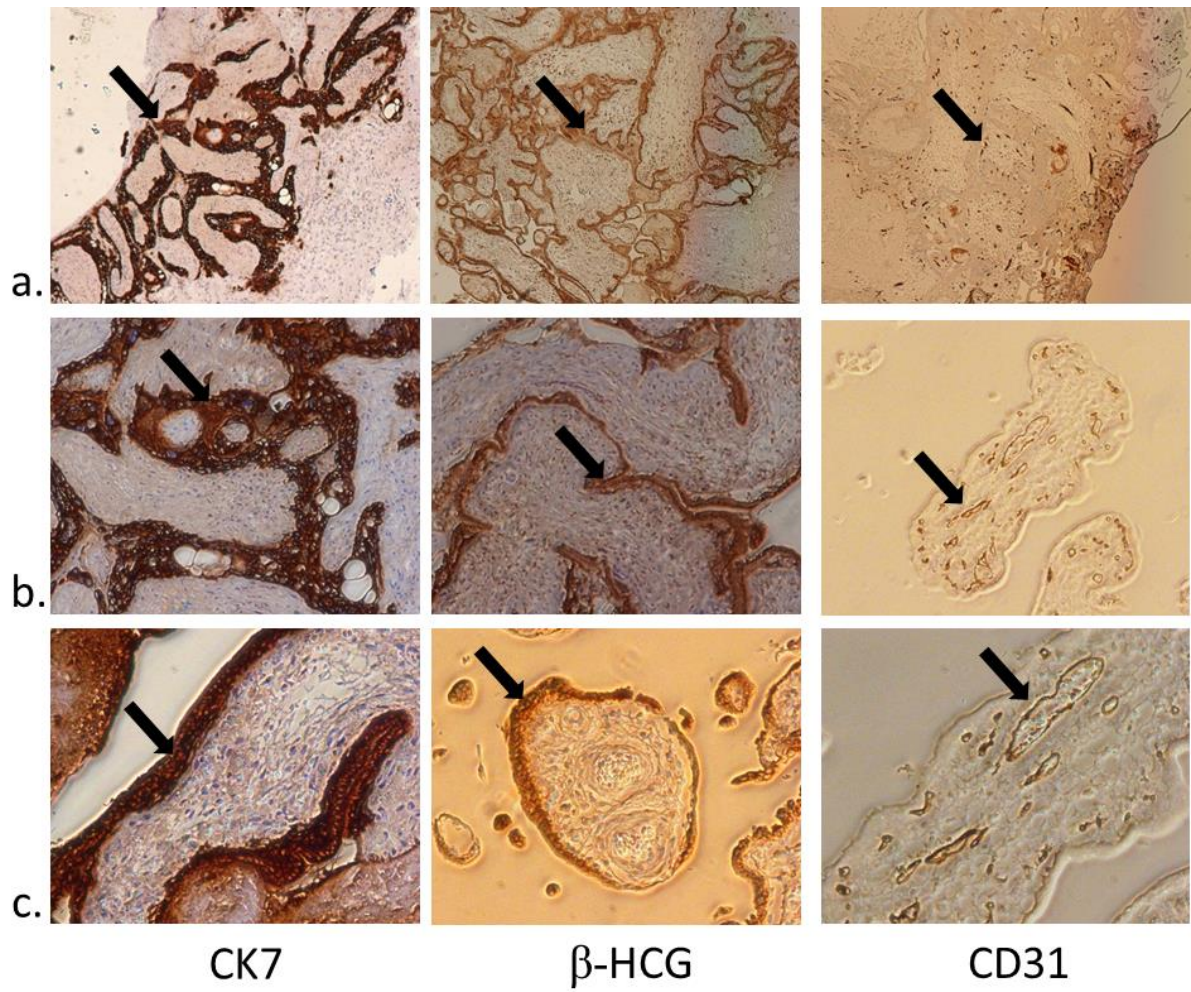


Figure 75 : Marquages des cellules des villosités placentaires par immunohistochimie

Grossissement x 500 (a), x 1000 (b), x 2000 (c)

Résultats

I) Modèle sous-cutané

a. Principe du modèle

Les souris sont greffées en sous-cutané après anesthésie générale (J0). Six jours post-greffe, les souris sont infectées par la souche AD169 (50 µl) par piqûre dans le greffon à travers la peau. A différents temps post-greffe (J7, J11, J15 et J21), les souris sont sacrifiées afin de récupérer les greffons. Chaque greffon est coupé en deux parties pour effectuer des marquages immunohistochimiques des compartiments cellulaires des villosités flottantes et pour mesurer les charges virales par qPCR Albumine/CMV.

b. Anatomie des compartiments cellulaires des villosités flottantes et infection par le CMVH

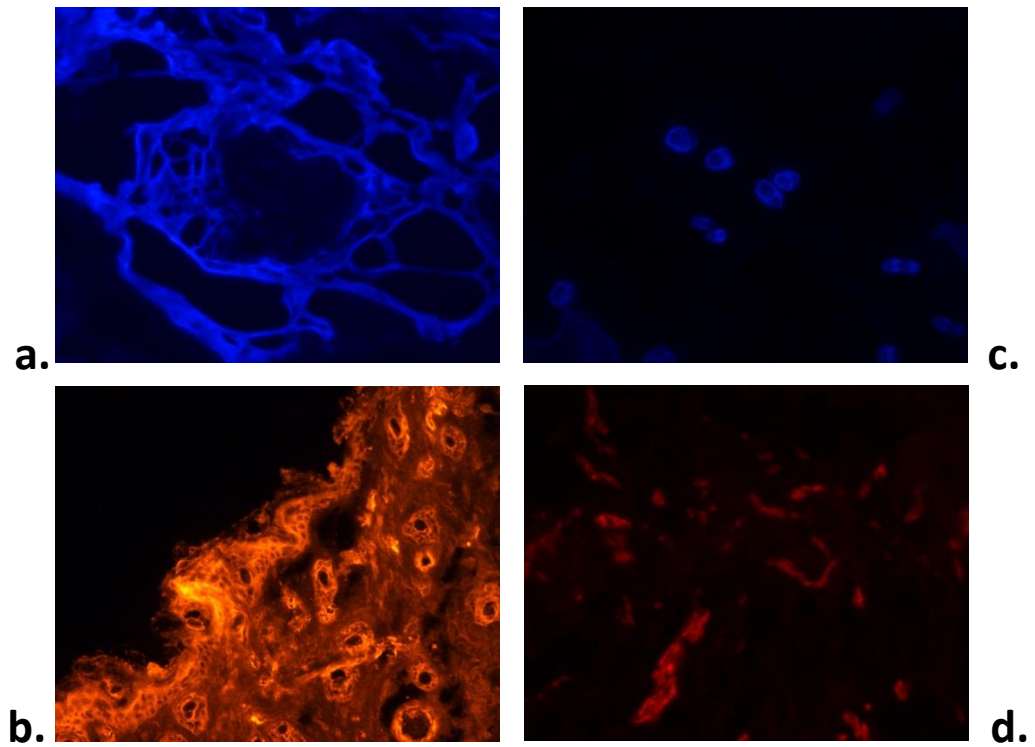
Plusieurs marquages ont été réalisés afin d'identifier les structures cellulaires des villosités flottantes du placenta et de déterminer le ou les types cellulaires dans le(les)quels le CMV se réplique. Nous avons fait des colorations en immunohistochimie (Figure 75) et en immunofluorescence (Figure 76).

Les trophoblastes peuvent être marqués par deux anticorps : l'anti-cytokératine 7 (CK7) et l'anti-β-hormone chorionique gonadotrophine (HCG).

CK7, nommé également sarcolectine (SCL) est un marqueur des cellules épithéliales.

HCG est un marqueur spécifique des syncytiotrophoblastes et des cytotrophoblastes.

Les vaisseaux sanguins sont colorés *via* l'anticorps anti-CD31 également nommé Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM-1), marqueur des cellules endothéliales.



**Figure 76 : Marquages des cellules des villosités placentaires
par immunofluorescence**

CK7 (a), HCG (b), Ki67 (c) et CD31 (d), grossissement x 4000

La vimentine est une protéine des filaments intermédiaires de type III qui est exprimée dans les cellules mésenchymales. Sa coloration permet d'observer le mésenchyme des villosités flottantes, structure entourée par les trophoblastes.

L'ensemble de ces marquages a permis de localiser les différentes structures des villosités flottantes du placenta chez la souris SCID. En revanche, au cours du temps post-greffe (J7, J11, J15 et J21), le CMV marqué avec l'anticorps anti-*Immediate Early Antigen* n'a pas été détecté par immunohistochimie dans ces différents compartiments, et ce malgré une charge virale détectable.

c. Prolifération cellulaire dans greffons

La prolifération cellulaire est vérifiée *via* l'anticorps anti-Ki67. Le rôle de cette protéine est peu connu. Ki67 est exprimée pendant les phases du cycle cellulaire G1, S, G2 et M, et est absente lors de la phase quiescente G0 (Scholzen and Gerdes 2000). Elle représente ainsi un bon marqueur de prolifération.

Nous avons observé le marquage Ki67 dans les coupes de greffons récupérés aux différentes dates post-greffe (J7, J11, J15 et J21) (Figure 77). A J7 post-greffe, nous remarquons la présence d'une coloration nucléaire marron au sein du mésenchyme des villosités flottantes, suggérant que les fibroblastes du mésenchyme sont en prolifération. En revanche, les trophoblastes ne présentent pas de marquage. Ces résultats sont concordants avec la littérature, puisque les syncytiotrophoblastes sont des cellules différenciées qui ne prolifèrent pas (Wakuda and Yoshida 1992; Ichikawa et al. 1998).

La coloration Ki67 a été comparée dans les coupes de greffons à J7 et J21 post-greffe. Le marquage des noyaux en marron est observé dans les deux conditions, suggérant ainsi que les cellules du mésenchyme sont en prolifération. Ces analyses permettent d'admettre que les greffons sont viables jusqu'à J21.

En revanche, cette technique de marquage anti-Ki67 a un inconvénient majeur. Elle ne permet pas de quantifier la prolifération cellulaire et ainsi de quantifier la viabilité du greffon au cours du temps post-greffe chez la souris SCID.

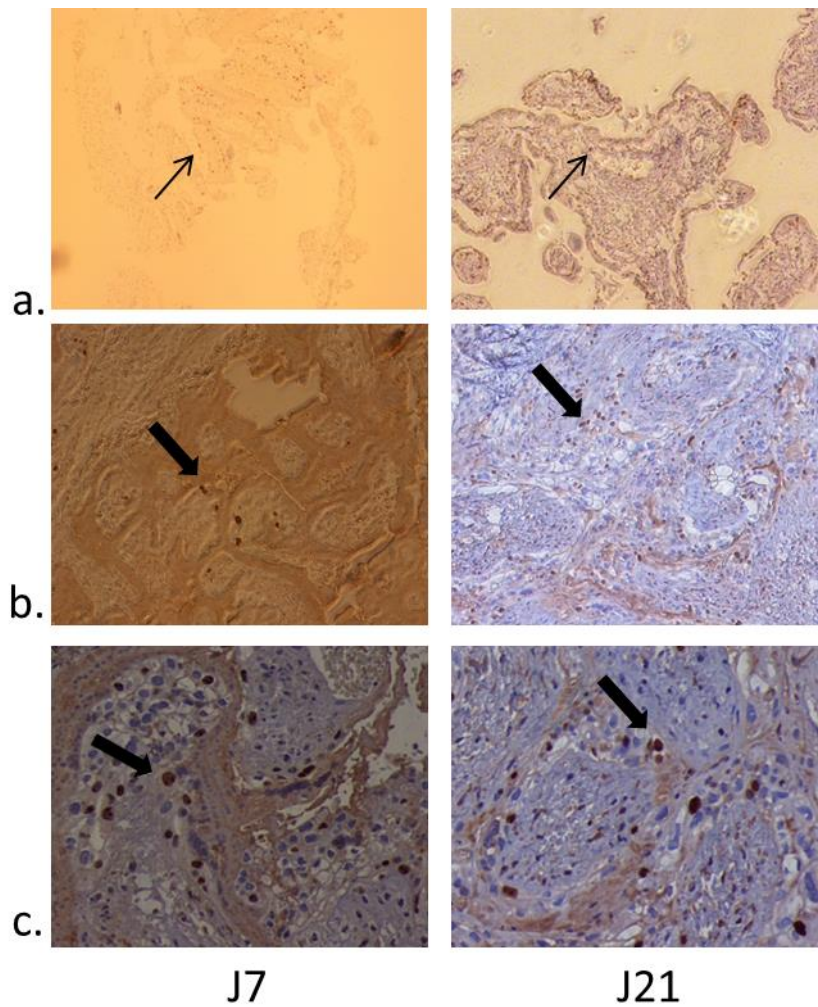


Figure 77 : Marquages des noyaux des cellules en prolifération via l'anticorps Ki67 dans les villosités placentaires au cours du temps post-greffe

Grossissement x 400 (a), x 1000 (b), x 2000 (c)

d. Cinétique de l'infection

Bien que le virus ne soit pas détecté dans les tissus placentaires par immunohistochimie, nous avons étudié la cinétique de l'infection virale à CMVH par qPCR albumine/CMVH (détaillée dans la publication). Les charges virales sont quantifiées en copies de CMVH par cellule (Figure 78). Aux différents temps post-greffe, les greffons analysés en qPCR sont les mêmes que ceux analysés en immunohistochimie.

A J7 post-greffe ou J1 post-infection, nous détectons une très faible charge virale dans les greffons de 0,0014 copie/cellule, ce qui signifie qu'une cellule sur 1000 est infectée. La charge virale est similaire à J11, mais en revanche, augmente à J17. Le pic d'infection à cette date correspond à 0,004 copies de CMV par cellule (1 cellule/250). A J21, l'infection est nulle.

Ces résultats sont concordants avec les analyses immunohistochimiques. Le virus n'est pas ou très peu présent dans les greffons chez les souris SCID. Dans le but d'augmenter l'infection des tissus placentaires, nous avons modifié la technique d'infection des greffons.

e. Cinétique de l'infection par trempage et traitement au cidofovir

i. Principe du modèle et cinétique de l'infection

La technique d'infection des greffons du modèle précédent, *via* l'injection du virus directement dans le greffon, n'a pas montré une efficacité. Nous avons amélioré l'infection en trempant les villosités placentaires (Jour 0) dans un bain de surnageant contenant les virions libres pendant 24 heures avant de les greffer chez la souris. Cette technique d'infection semble plus adéquate en raison de la similarité de l'infection *in situ* par contact direct entre les villosités et le sang maternel contaminé.

Nous avons mesuré la cinétique d'infection pendant 13 jours. A J4, J8 et J13, les greffons sont récupérés pour mesurer la charge virale de CMVH (Figure 78).

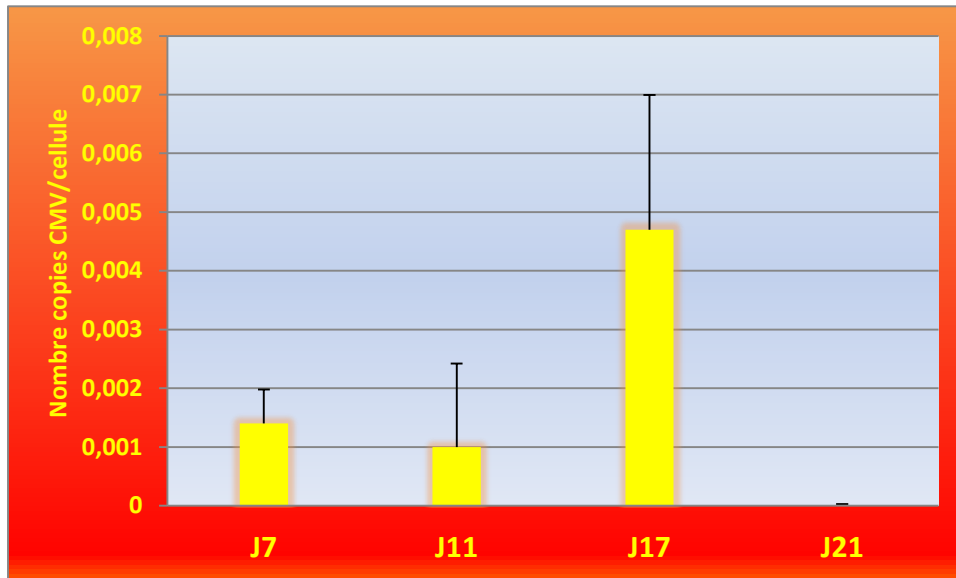


Figure 78 : Cinétique de l'infection à CMVH dans les greffons de villosités flottantes de placenta chez la souris

A J4, les charges virales des greffons sont nulles, puis augmentent légèrement à J8. A cette date, on compte 1,8 cellules d'infectées sur un total de 1000 cellules. En revanche, l'infection est apparente à J13. La charge virale de la souche AD169 est de 2,4. Ces analyses montrent que le cycle de réplication du CMV est lent dans les greffons. Il faut attendre 13 jours avant d'observer une forte charge virale. Ce modèle d'infection par trempage des villosités est plus efficace pour reproduire une infection et semble plus juste de l'infection congénitale.

ii. Efficacité antivirale du cidofovir

Dans ce modèle d'infection par trempage, nous avons testé l'efficacité du cidofovir contre l'infection à CMVH. Nous avons choisi préférentiellement cette molécule pour deux raisons. Tout d'abord, cette drogue est connue à avoir une efficacité anti-CMVH *in vitro* et *in vivo*, et de plus, cette drogue ne nécessite pas de phosphorylation par la kinase virale pour être active, contrairement au ganciclovir.

Le traitement au cidofovir a débuté le lendemain des greffes (J1). Les souris sont traitées par voie intrapéritonéale avec 25 ou 50 mg/kg de CDV tous les deux jours pendant 12 jours.

A J8, les souris traitées avec 25 ou 50 mg/kg de CDV présentent une faible quantité de virus dans les greffons (Figure 79). La différence de charges virales entre les souris infectées traitées ou non n'est pas importante. A cette date, nous ne pouvons pas confirmer de l'efficacité antivirale de cette molécule. En revanche, à J13, l'infection virale des greffons est inhibée par cette molécule. Le cidofovir à 25 mg/kg conduit à une réduction de 120 fois (0,02 copie de CMV/cellule) la quantité de virus présent dans les greffons par rapport au groupe placebo non traité (2,4 copies de CMV/cellule). L'augmentation de la concentration en cidofovir à 50 mg/kg conduit à une meilleure efficacité antivirale, soit une réduction d'environ 1700 fois par rapport aux souris non traitées. La charge virale détectée chez ces souris traitées est quasi nulle, soit 0,0014.

L'ensemble de ces résultats montre que ce modèle *in vivo* permet l'infection des villosités flottantes du placenta. L'infection par trempage est plus efficace que par injection dans le greffon.

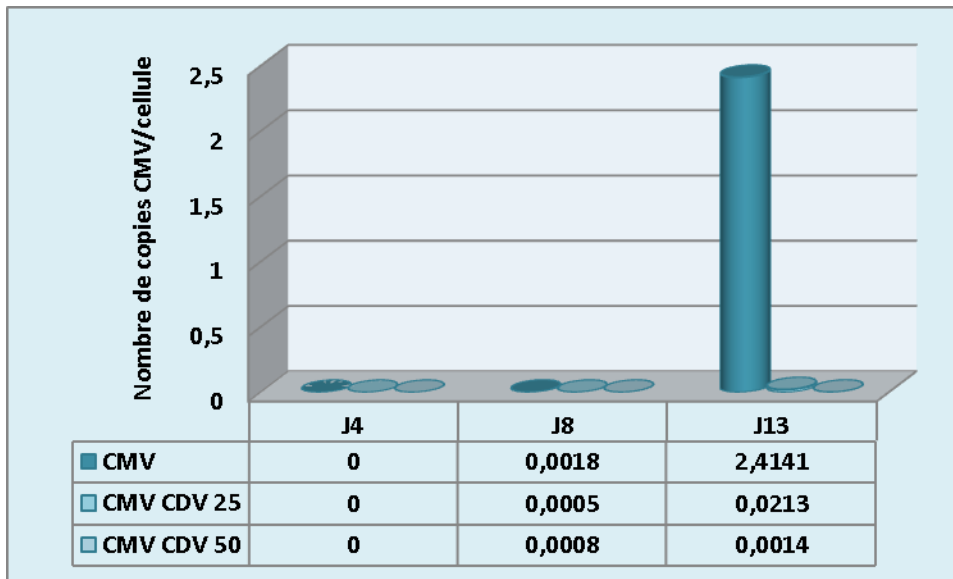


Figure 79 : Efficacité du cidofovir contre l'infection à CMVH dans les greffons de villosités flottantes de placenta chez la souris

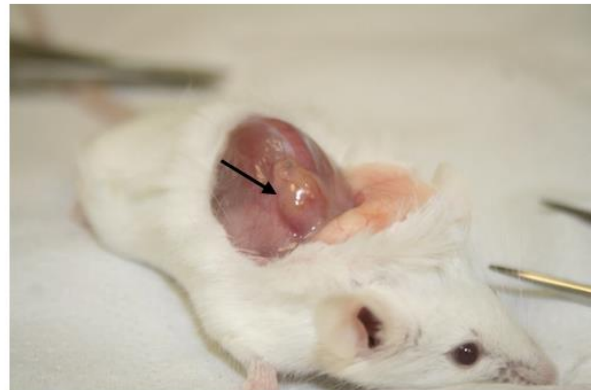
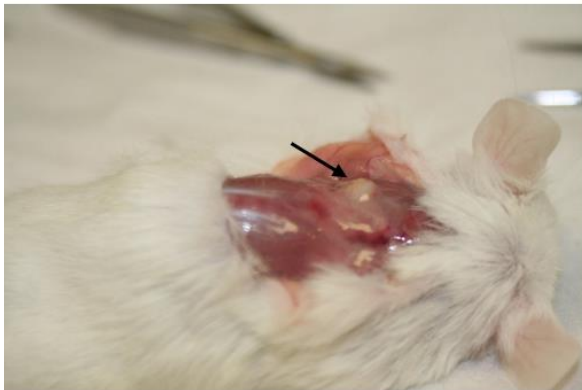
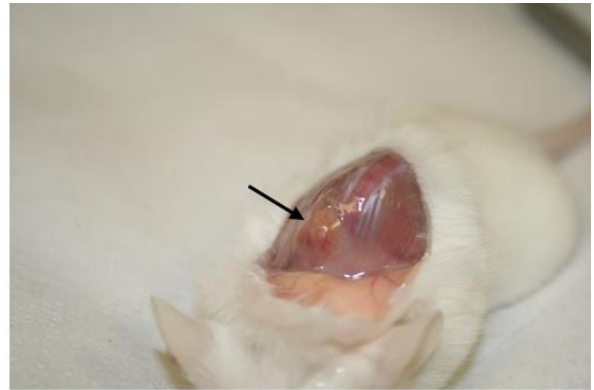
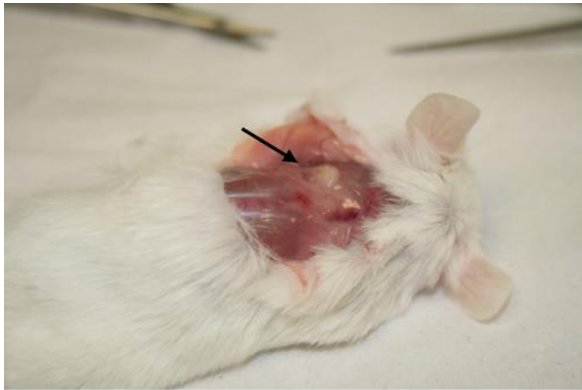
Toutefois, il serait intéressant d'allonger la cinétique d'infection et de quantifier les charges virales à J28. Ce modèle a également permis de montrer l'efficacité du cidofovir dans les cellules placentaires par administration intrapéritonéale, ce qui montre indirectement la vascularisation des greffons.

Ce modèle pourrait davantage être amélioré dans le cadre de l'étude de molécules administrées par voie orale. Les molécules administrées *per os* sont absorbées dans l'appareil digestif, transformées dans le foie, puis passent dans la circulation sanguine pour atteindre les organes, où elles exercent leur action. Un inconvénient majeur de cette administration est le délai avant l'apparition de l'effet. Ainsi, dans notre modèle, nous avons voulu réduire ce délai en augmentant la vascularisation du tissu, par greffe sous-musculaire.

II) Modèle sous-musculaire

a. Principe du modèle

Le modèle consiste à greffer des villosités flottantes de placentas en sous-musculaire au niveau dorsal des souris SCID. Sept jours post-greffe, les souris sont gavées avec différentes concentrations de norleucine, un acide aminé de synthèse (Figure 80). Au bout de plusieurs heures, les greffons ou le sang des souris sont récupérés et analysés par HPLC. Le développement de ce modèle s'est effectué par plusieurs tests successifs afin de déterminer d'une part, la concentration en norleucine pouvant être détectée dans les greffons, et d'autre part, le temps nécessaire à cette molécule à atteindre la circulation sanguine, et ainsi les organes.



J7 post-greffe

J21 post-greffe

Figure 80 : Villosités placentaires greffées chez la souris SCID en sous-musculaire

b. Validation de la vascularisation

Le premier test a consisté à administrer *per os* chez les souris SCID, plusieurs concentrations de norleucine : 5, 10, 20 et 40 mM. Le sang des rongeurs a été récupéré 3h30 après l'administration de la molécule, puis analysé par HPLC.

L'analyse de chromatographie montre que la norleucine n'est pas détectée dans le sang pour les concentrations de 5, 10 (Figure 81) et 20 mM (Figure 82). En revanche, à 40 mM (Figure 82), nous observons un léger pic. Toutefois, ce pic est relativement faible et pourrait être un artefact plus que le résultat positif de la présence de la molécule. De ce fait, nous avons augmenté la concentration en norleucine à 300 et 600 mM et le temps de récupération du sang à 4 et 6 heures post-gavage.

A 300 mM de norleucine, cette molécule est détectée aussi bien à 4 h qu'à 6 heures post-gavage (Figure 83). Lorsque l'on augmente la concentration à 600 mM, le graphique présente également un pic, représentatif de la présence de la molécule dans le sang des souris, pour les temps de 4h et 6h (Figure 84).

Dans notre dernier test effectué, les souris SCID ont été greffées avec des villosités flottantes de placentas issus d'IVG. Sept jours post-greffe, la norleucine est administrée *per os* (300 mM) chez les souris. Elles sont sacrifiées quatre heures après le gavage afin de récupérer les greffons et de les analyser en HPLC.

Les résultats révèlent la présence d'un pic pour toutes les souris testées à sept jours post-greffe (Figure 85).

Pour conclure, ces analyses permettent de confirmer la présence de norleucine dans les greffons de placentas à partir d'une concentration initiale de 300 mM. Le temps de récupération des tissus placentaires est d'environ 4 heures post-gavage. Ce modèle permet de confirmer que les greffons placentaires sont vascularisés à partir de sept jours post-greffe (Figure 85).

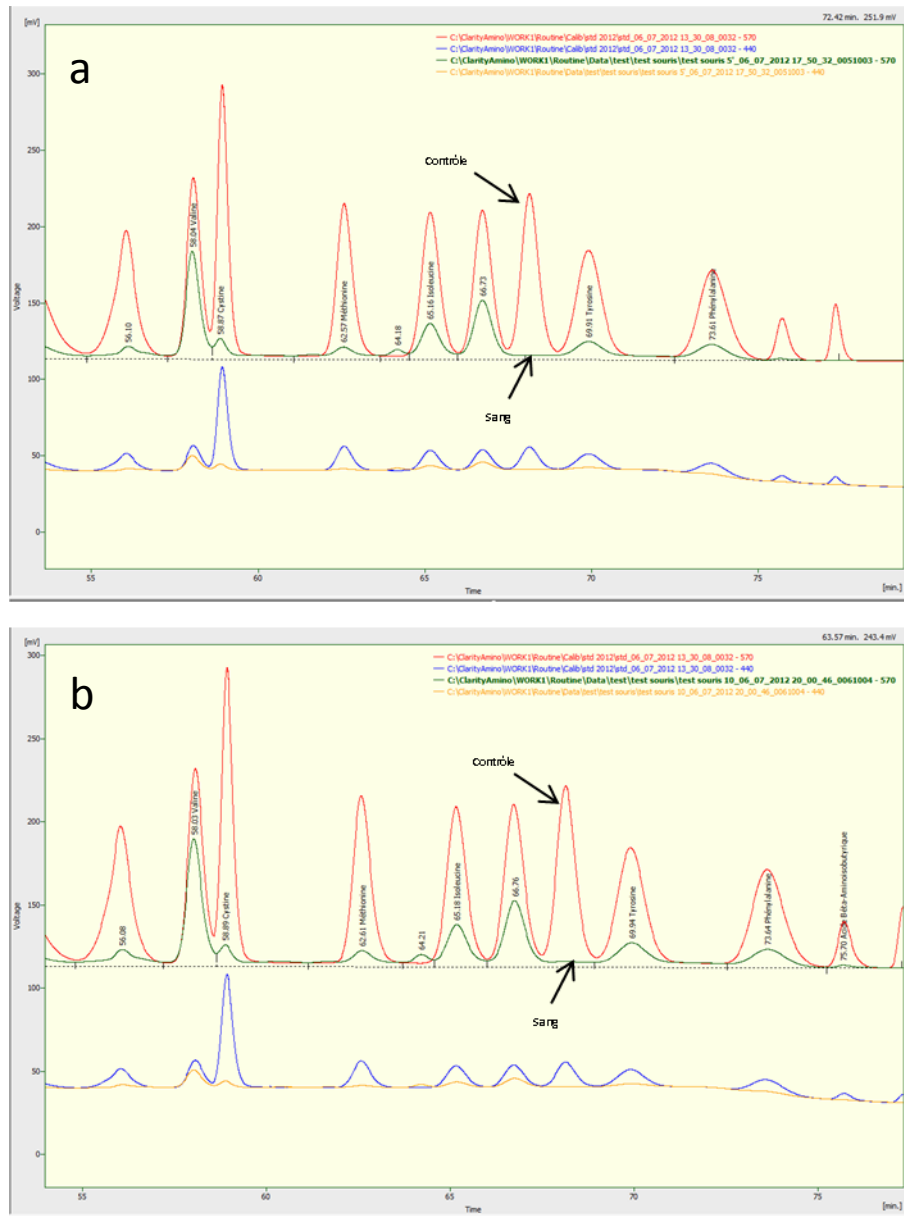


Figure 81 : Détection de norleucine à 5 (a) et 10 (b) mM dans le sang des souris 3h30 post-gavage

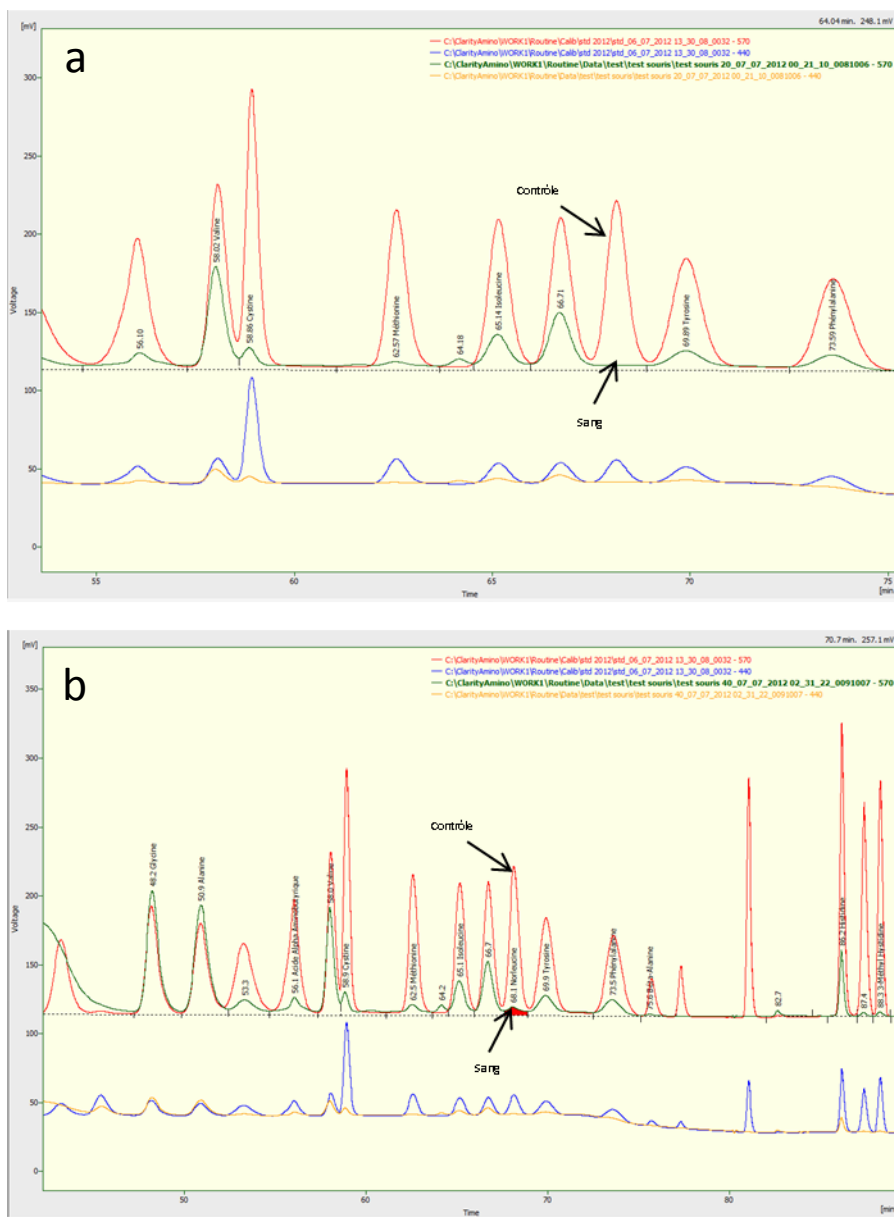


Figure 82 : Détection de norleucine à 20 (a) et 40 (b) mM dans le sang des souris, 3h30 post-gavage

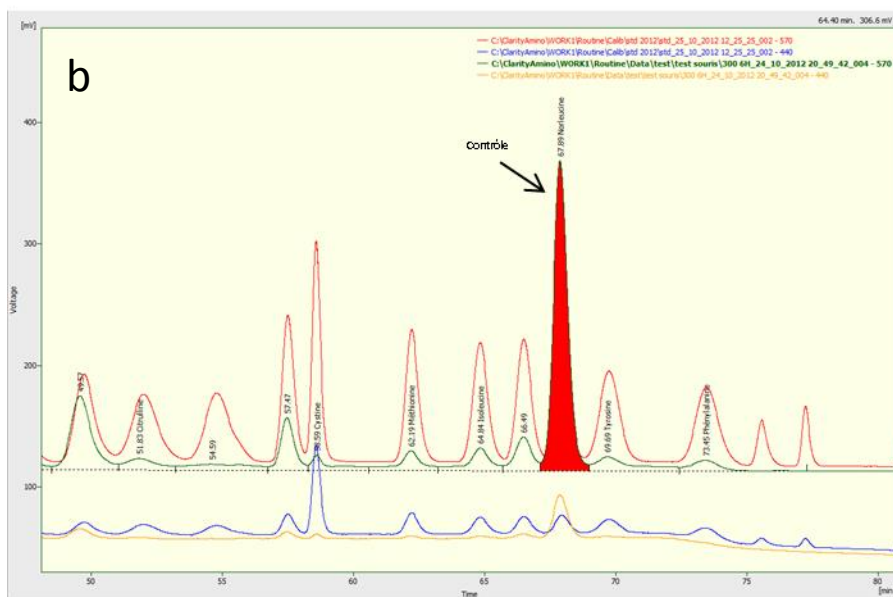
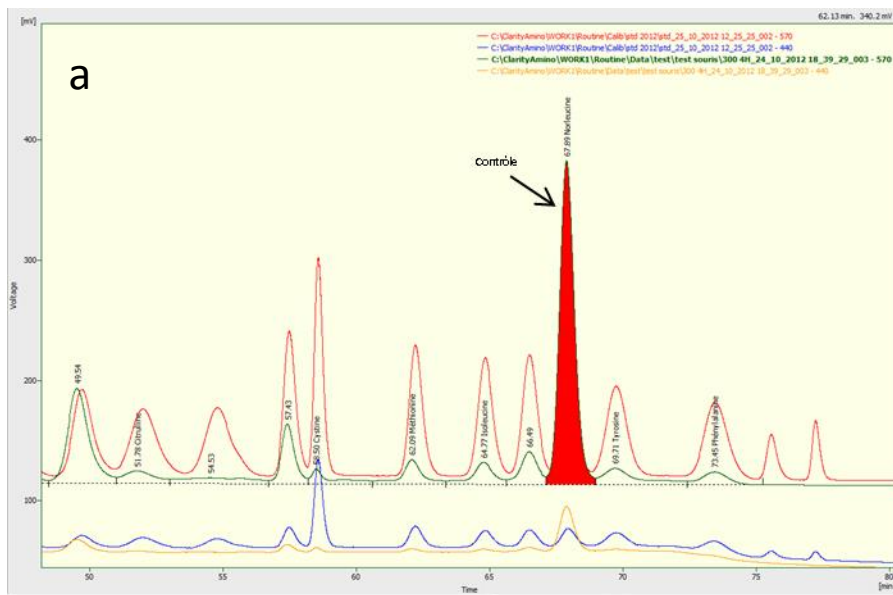


Figure 83 : Détection de norleucine à 300 mM dans le sang des souris à 4h (a) et 6h (b) post-gavage

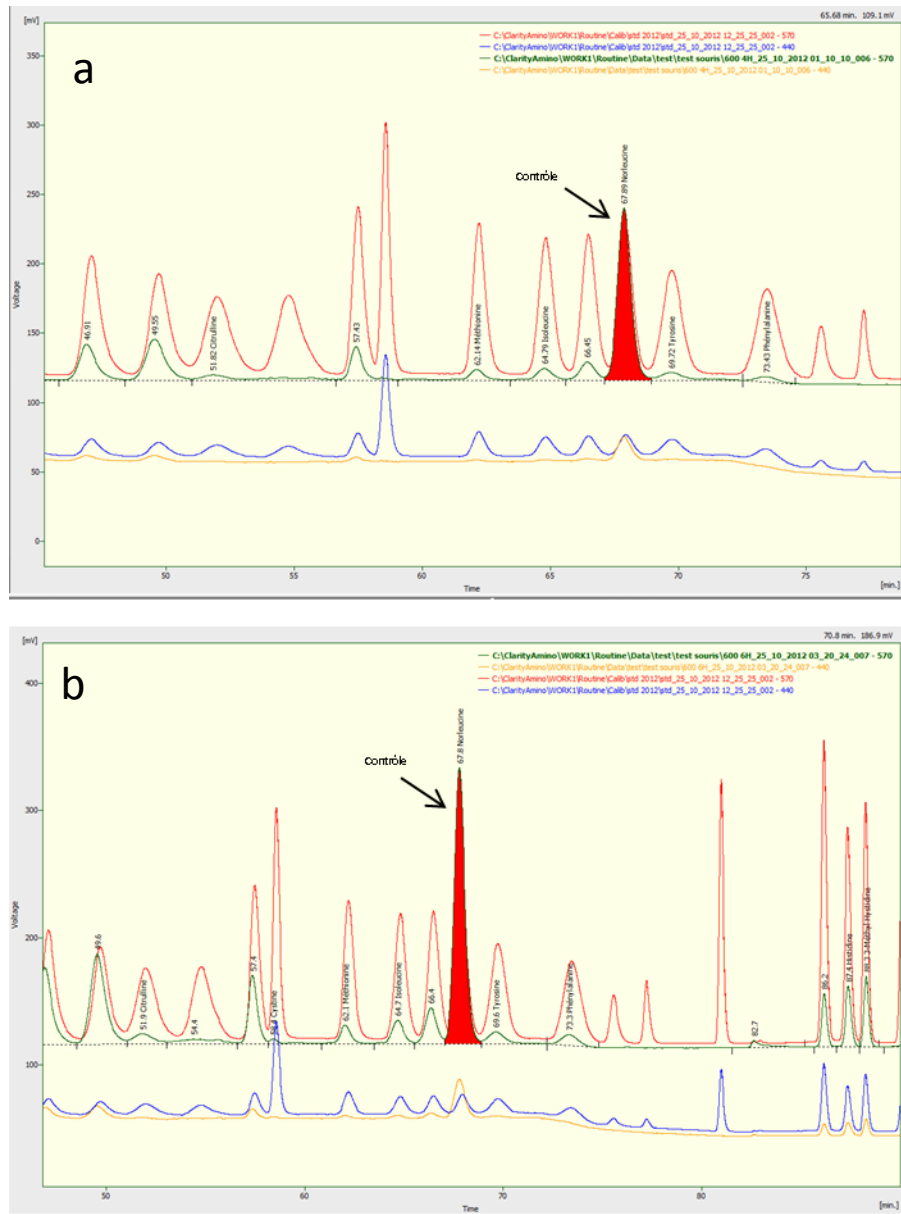


Figure 84 : Détection de norleucine à 600 mM dans le sang des souris à 4h (a) et 6h (b) post-gavage

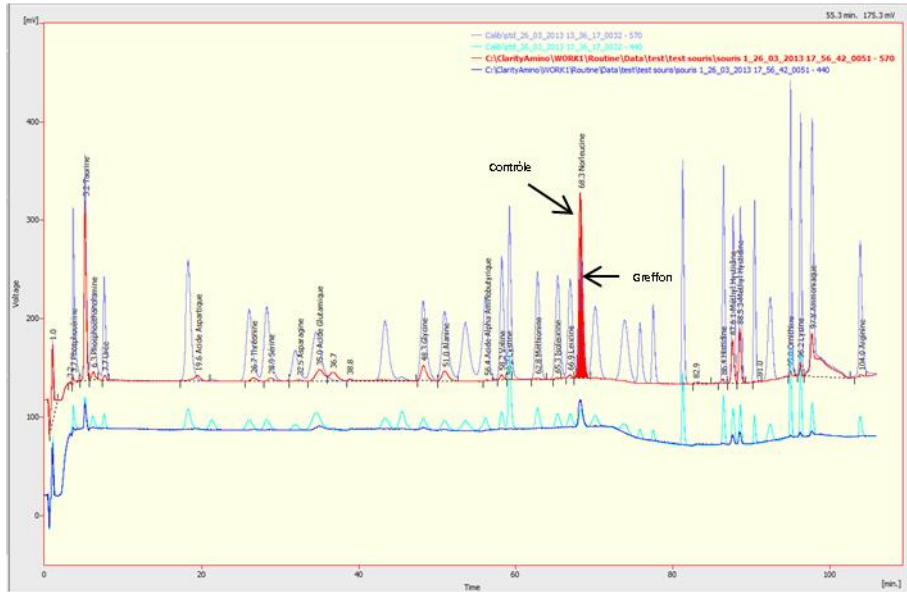
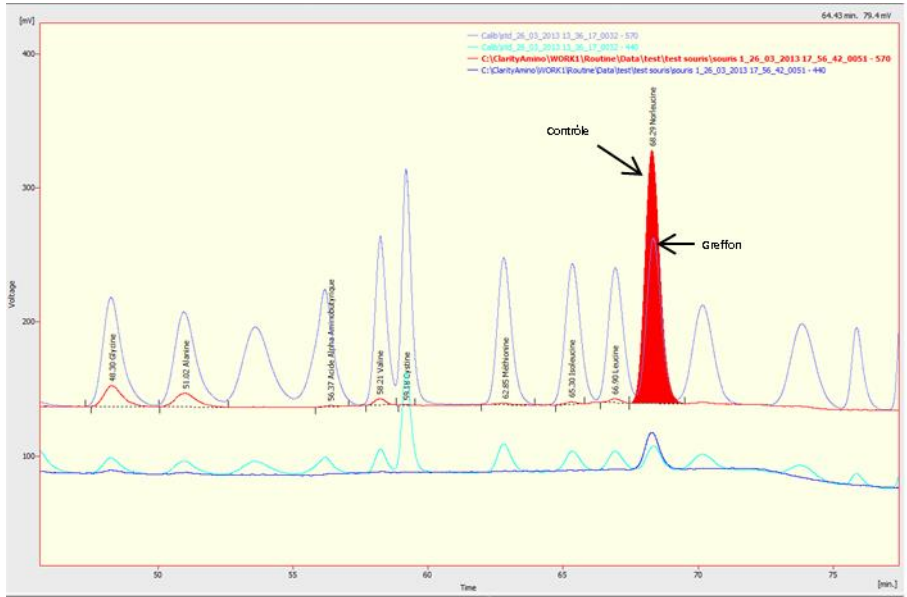


Figure 85 : Détection de norleucine (300 mM) dans les greffons de souris, 4h post-gavage, 7 jours post-grefe

Conclusion

Nous avons développé deux modèles d'infection placentaire à CMVH chez la souris SCID. Dans le premier modèle en sous-cutané, nous avons comparé l'efficacité de l'infection des villosités placentaires par deux techniques, *via* l'injection de virions libres intra-greffon et *via* le trempage des villosités dans du surnageant d'AD169. La technique par trempage permet une meilleure infection des tissus et est plus représentative de l'infection *in situ*. En effet, lors de l'infection transplacentaire du CMVH, les leucocytes maternels CMV⁺ contenus dans le sang maternel pourraient infecter les villosités flottantes du placenta *via* les syncytiotrophoblastes.

La viabilité des greffons a été vérifiée au cours du temps post-greffe *via* l'anticorps Ki67, un marqueur de la prolifération cellulaire. L'analyse immunohistochimique et immunofluorescente révèle la présence de ce marqueur au cours du temps post-greffe, suggérant ainsi la viabilité des tissus. En revanche, cette technique ne permet pas de quantifier la présence d'anticorps anti-Ki67, et l'analyse d'une coupe sur un greffon n'est pas forcément représentative de l'ensemble du greffon. Il serait intéressant de vérifier la viabilité des tissus greffés par une autre méthode. La détection de marqueurs apoptotiques tels que la caspase 3 ou la poly ADP-ribose polymérase (PARP) par western blot pourrait confirmer nos résultats.

Nous avons montré que le cidofovir a une efficacité antivirale dans le modèle d'infection en sous-cutané. Il serait intéressant de mesurer son efficacité dans une cinétique plus longue contre la souche congénitale d'infection P*.

Le développement du modèle « sous-musculaire » est intéressant dans l'étude de l'efficacité de traitements anti-CMV administrés par voie orale. Nous avons vérifié la vascularisation du greffon à J7 par une approche originale. Il serait intéressant de développer davantage ce modèle. La cinétique de l'infection virale CMVH pourrait être quantifiée chez ces souris. Ce modèle pourrait permettre une meilleure réplication du virus dans le tissu placentaire en raison d'une meilleure vascularisation du greffon par rapport au modèle sous-cutané. Après validation de l'infection, il sera intéressant de conserver le cidofovir comme contrôle positif, puis de tester de nouvelles molécules administrées par voie orale, telles que le maribavir, l'artésunate, le CMX001 ou le létermovir.

Discussion générale

L'infection congénitale à CMVH est un problème de santé publique mondial. Les conséquences pathologiques sévères de ce virus chez le fœtus et l'absence de molécules thérapeutiques chez la femme enceinte témoignent de l'importance de la recherche dans ce domaine. Depuis la découverte du CMVH dans les années 1970, des modèles d'infections congénitale et périnatale ont vu le jour. Ces modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* ont permis des avancées dans la compréhension du mécanisme de transmission du virus de la mère au fœtus et au nouveau-né. Ces modèles ont permis d'identifier les cellules placentaires permissives au CMV et de proposer des voies éventuelles de propagation virale transplacentaire.

Notre travail s'est axé sur le développement de modèles *ex vivo* et *in vivo* d'infection placentaire par le CMVH. Dans ces modèles, nous avons choisi d'infecter les villosités flottantes placentaires de 1^{er} trimestre de grossesse car c'est à ce stade de la gestation que les conséquences de l'infection à CMV sont les plus graves. Nous avons choisi préférentiellement les placentas issus d'interruptions volontaires de grossesses afin de limiter au maximum toutes autres causes d'infection ou d'ischémie placentaire qui biaiseraient les résultats ou compromettraient la survie des explants. Une recherche d'IgG CMV dans le sang placentaire a permis d'éliminer les placentas CMV⁺. Les villosités flottantes, qui sont situées du côté fœtal, sont en contact direct avec le sang maternel et sont le siège de la transmission du virus de la mère au fœtus (Altshuler and McAdams 1971; Becroft 1981; Maidji et al. 2006). En effet, les cellules composant ces villosités sont permissives pour la réplication du virus, aussi bien les cytotrophoblastes que les fibroblastes du mésenchyme embryonnaire et, à un moindre degré, les syncytiotrophoblastes (Muhlemann et al. 1992; Fisher et al. 2000). L'utilisation de la décidua comme modèle *ex vivo*, tel que l'ont décrit Weisblum et al. permet d'analyser la capacité des molécules antivirales à inhiber la réplication dans le placenta (Weisblum et al. 2011). Nous nous sommes également intéressés à l'inhibition du virus au moment de la transmission de la mère au fœtus, *via* les villosités flottantes du placenta. Les villosités peuvent être choisies comme modèle pour des études physiopathologiques de la transmission ou de l'impact du CMV sur la barrière foeto-placentaire. Les analyses immunohistochimiques (présentées dans la publication) ont révélé la présence de glycoprotéines de surface gB et des protéines *immediate early* du CMVH dans les syncytiotrophoblastes, les cytotrophoblastes ainsi que dans les fibroblastes du mésenchyme.

Les analyses réalisées sur des explants de J0 à J24 sont en accord avec celles de Maidji et al. (Maidji et al. 2006), qui ont pu montrer une propagation du CMV des syncytiotrophoblastes vers les cytotrophoblastes jusqu'au mésenchyme des villosités, ce qui suggère ensuite une infection des cellules endothéliales fœtales et ainsi la dissémination virale jusqu'au fœtus *via* la veine ombilicale. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les antigènes très précoces (IEA) mais aussi tardifs (gB) montre que le virus infecte les explants et qu'il s'y réplique, ce qui est confirmé par les cinétiques de charge virale, aussi bien avec la souche de référence délétée de certaines régions liées au pouvoir invasif du virus, AD169, qu'avec l'isolat clinique P*. En parallèle, nous avons pu valider la viabilité des explants par la quantification de β -HCG au fil du temps. Par la suite, nous avons donc choisi d'évaluer la réplication de l'ADN viral en déterminant les conditions optimales de détection du virus par quantification des charges virales au cours du temps post-infection, méthode déjà utilisée pour déterminer l'efficacité des molécules agissant sur les phases très précoces du cycle viral ainsi que des inhibiteurs de polymérase en culture cellulaire (Schnepf et al. 2010).

Dans notre modèle *ex vivo*, nous avons quantifié la charge virale présente dans chaque explant de villosités par qPCR. Cette technique nous a permis d'une part, de déterminer la cinétique de l'infection de deux souches virales humaines et d'autre part, de quantifier l'efficacité de traitements antiviraux. Notre travail a l'avantage d'étudier une souche clinique d'infection congénitale P*, isolée d'urine de nouveau-né. La quantification des charges virales a permis d'établir la durée nécessaire au virus pour atteindre un pic de réplication. Les données de quantification de charges virales sont confirmées par les analyses immunohistochimiques. De manière intéressante, le cycle de réplication de la souche clinique P* est plus lent que celui de la souche AD169, avec un pic de réplication à J20. Cependant l'analyse des coupes de villosités révèle une production d'antigènes tardifs avec la souche P* à J18, alors que le virus AD169 est quasiment indétectable. Ainsi, nous avons fixé à J18 le temps de révélation des essais antiviraux *ex vivo*.

Les études sur ce modèle sont réalisées en collaboration avec l'équipe de W. Rawlinson (Australie), qui utilise un modèle similaire pour l'étude de la réponse cytokinique à l'infection à CMV dans le placenta à terme (Hamilton et al. 2012). Nous pourrions ainsi comparer entre les placentas de 1^{er} et du 3^{ème} trimestre de grossesse, les cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire à l'infection à CMVH ainsi que l'efficacité de nouveaux antiviraux. Pour réaliser cette comparaison, le surnageant de plusieurs cinétiques virales ou d'essais antiviraux *ex vivo* a d'ores et déjà été collecté.

Le développement du modèle *ex vivo* a nécessité plusieurs étapes de mise au point pour l'obtention d'une infection virale satisfaisante. Ainsi, nous avons pu améliorer la cinétique de l'infection ainsi que la viabilité des explants par l'utilisation d'une éponge de gélatine de porc dans les cultures placentaires. Cette éponge a par ailleurs l'avantage d'empêcher l'infection virale par contact entre cellules et permet de ce fait, de se rapprocher davantage de l'infection *in situ* c'est-à-dire d'une infection par capillarité. La viabilité des explants est un point important qui conditionne la réplication du CMVH dans les explants. Afin de déterminer de façon plus précise cette viabilité, nous avons procédé en plus des analyses immunohistochimiques des caspases (résultats non montrés), à la quantification de la β -HCG dans le surnageant des explants, au cours du temps « post-culture ». Cette hormone est fortement sécrétée au cours du 1^{er} trimestre de grossesse par les syncytiotrophoblastes et à un moindre degré par les cytotrophoblastes. La mesure automatisée de β -HCG par un procédé identique à celui des tests de mesure de la β -HCG sérique, validé sur le surnageant de culture, a permis la quantification de cette hormone dans de nombreux échantillons. En raison de la courte demi-vie de la β -HCG (24 à 48h), sa persistance dans le surnageant de culture indique son excrétion, ce qui témoigne de la viabilité des trophoblastes. Cette technique de mesure de la viabilité originale et inédite, nous a permis de montrer que les villosités flottantes survivent dans le milieu de culture au moins jusqu'à J50 « post-culture » (résultats non montrés).

Nous avons montré que le modèle *ex vivo* permet l'étude de la cinétique de l'infection virale CMVH et l'étude de l'efficacité de nouveaux antiviraux. La contrainte majeure dans le développement de ce modèle a été la taille des placentas issus d'interruptions volontaires de grossesses. En effet, leur taille minimale permet d'isoler peu d'explants par placenta (moyenne de 24 explants/placenta), ce qui restreint le nombre d'échantillons par condition testée. Cette contrainte empêche les études multiparamétriques sur un même placenta. D'autre part, l'hétérogénéité de l'origine des placentas implique la validation des données à partir d'explants issus d'au moins deux placentas différents.

La limite de notre modèle *ex vivo* réside dans le fait que celui-ci est un modèle tissulaire, qui ne permet pas l'analyse de l'efficacité de drogues thérapeutiques, telles qu'elles sont administrées dans l'organisme. Ainsi, les variations de pénétration des antiviraux au site de l'infection et leur pharmacocinétique ne peuvent être étudiées *ex vivo*.

Le développement de modèle d'infection placentaire *in vivo* est donc indispensable pour déterminer l'efficacité antivirale et la toxicité de nouveaux traitements administrés par voie générale. Le principal handicap des modèles animaux d'infection congénitale, chez le cochon d'Inde notamment, est la diversité inter-espèce des gènes cibles des molécules antivirales. Par exemple, chez cette espèce animale, le ganciclovir n'est pas phosphorylé par la kinase du GPCMV (Fong et al. 1987; Woolf et al. 1988) tandis que la kinase du CMV murin phosphoryle le ganciclovir, mais le modèle d'infection congénitale diffère considérablement de celui observé chez l'homme. L'alternative que nous avons choisie a l'intérêt de permettre l'infection directement par des souches de CMVH et donc de tester l'efficacité antivirale sur des panels de souches cliniques, et ce, quel que soit l'antiviral et son mécanisme d'action. Cependant, notre modèle ne permet pas d'étudier l'impact d'un traitement sur l'ensemble du processus d'infection à CMV, transmission et infection du fœtus. Sa place pourrait se situer entre les essais *ex vivo* et le modèle GPCMV recombinant, et comme modèle d'étude de toxicité des antiviraux. Jusqu'à présent, il n'existait pas de modèles humanisés d'infection placentaire chez la souris. Le placenta est un tissu mou, capable de se multiplier et de diffuser lorsqu'il est greffé en intrapéritonéal et donc difficile à localiser après greffe. Il aurait été possible d'isoler des trophoblastes et de les greffer en sous-cutané, dans un gel vascularisable type « gelfoam », comme cela a déjà été réalisé sur fibroblastes pour l'étude de la physiopathologie du VZV ou pour l'étude de l'efficacité *in vivo* du létermovir sur le CMVH. Cependant, le recueil des trophoblastes est long et de faible rendement, ces cellules sont fragiles. De plus, ce modèle ne permet pas l'étude de l'infection au sein même du tissu organisé. Dans le modèle de Kern et al. (Kern et al. 2001) qui nous a servi de référence, les tissus sont greffés sous la capsule rénale. Cette localisation assure un bon maintien du greffon et une bonne vascularisation à priori, mais sur ce dernier point, nous n'avons trouvé aucune validation dans la littérature. La greffe sous capsulaire rénale étant délicate, et nos greffons relativement volumineux, nous devons rechercher un autre site de greffe et en valider la bonne vascularisation. Nous avons, au sein de l'équipe, développé deux modèles de souris immunodéprimées SCID greffées avec des villosités flottantes de placentas de 1^{er} trimestre de grossesse. Dans le modèle initial, les souris sont greffées en sous-cutané au niveau dorsal. Dans ce modèle, nous avons comparé deux techniques d'infection virale : pré-greffe par trempage des villosités dans du surnageant infectieux, ou post-greffe en injectant directement dans le greffon du surnageant de virions. La technique par trempage a montré une meilleure infection des greffons, bien que le virus ne soit détecté qu'à partir de J13 post-infection. Dans ce modèle, il n'était pas possible de doser la β -HCG de façon simple et fiable.

La viabilité des greffons a donc été vérifiée au cours du temps post-greffe en présence ou non de virus par marquage de Ki67, une protéine exprimée lors de la prolifération cellulaire. A ce moment, nous ne disposons pas du test à la norleucine pour vérifier la vascularisation, et nous nous en sommes tenus à l'examen macroscopique et immunohistochimique. Ce modèle de greffe sous-cutané a permis de tester l'efficacité du cidofovir *in vivo*. Cette molécule de référence a été choisie car elle ne nécessite pas de phosphorylation *via* les protéines virales pour devenir active, contrairement au ganciclovir. A J13 post-infection, cette molécule est capable d'inhiber 120 fois l'infection par rapport aux greffons non traités, à une concentration de 25 mg/kg et 1700 fois, à 50 mg/kg. Ces concentrations sont celles ayant fait la preuve de leur efficacité dans le modèles de Kern et al. (Kern et al. 2001), en injection un jour sur deux.

Nous avons voulu améliorer notre modèle d'infection pour l'utilisation de molécules thérapeutiques administrées *per os*. Pour cette application, la détermination de la vascularisation des greffons au cours du temps post-greffe est essentielle. Plusieurs techniques ont été réalisées mais n'ont pas donné de résultats satisfaisants : nous avons testé l'injection intraveineuse de bleu de méthylène dans la queue des souris greffées, mais aussi par voie intracardiaque par un système de pompe péristaltique, espérant détecter ce colorant dans des coupes de greffons. Nous avons également tenté de vérifier la présence de la circulation sanguine dans ces greffons par échographie. Mais les vaisseaux des greffons étant trop petits, ils n'étaient pas visibles avec la sonde disponible. Toutes ces techniques n'ont pas abouti à des conclusions satisfaisantes. Notre dernière tentative, qui a porté ses fruits, a permis de vérifier à J7 post-greffe, la vascularisation des greffons sous-musculaire chez la souris. La technique développée est innovatrice et a été développée en collaboration avec l'assistant praticien hospitalier Yoanne Mousseau au service de biochimie du CHU de Limoges. Le principe consiste à administrer par voie orale un acide aminé de synthèse (la norleucine), qui n'est ni présent chez la souris ni chez l'homme et de le détecter ensuite dans le greffon par chromatographie HPLC. La mise en place de cette technique s'est réalisée par paliers. La concentration de la norleucine administrée *per os* chez la souris a été déterminée (300 mM) ainsi que le temps nécessaire à cet acide aminé à atteindre le greffon *via* la circulation sanguine (4 heures). La cinétique de l'infection des greffons doit maintenant être vérifiée. Le cidofovir pourrait être testé comme contrôle dans ce modèle de greffe sous-musculaire, avant de tester l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques. Il serait également intéressant de tester des anticorps neutralisants contre l'infection CMVH *in vivo*.

La toxicité spécifique des molécules sur les cellules placentaires pourrait être démontrée par western blot, *via* la détection de marqueurs apoptotiques telles que la caspase 3.

Un des inconvénients majeurs des inhibiteurs de polymérase actuellement utilisés pour traiter les infections à CMVH est leur toxicité, qui interdit leur usage chez la femme enceinte, et limite leur utilisation en transplantation. Le deuxième inconvénient est lié à la persistance du virus, qui implique des traitements prolongés, tant que le système immunitaire ne recouvre pas une efficacité suffisante pour limiter les réactivations. C'est le cas notamment en transplantation, où ces traitements prolongés induisent des résistances, pouvant conduire à une impasse thérapeutique. La recherche de composés moins toxiques mais aussi de cibles différentes est donc une nécessité. Parmi ces nouveaux antiviraux, deux sont disponibles en ATU, le maribavir et l'artésunate, dont la toxicité est très faible. Cependant, leur efficacité apparaît inégale selon les patients, sans que des facteurs évidents, tels qu'une résistance virologique puissent expliquer ce phénomène. Comme dans d'autres infections virales, l'utilisation de combinaisons de molécules de mécanismes d'action différents, voire complémentaires pourrait améliorer l'efficacité antivirale ou limiter l'émergence de résistances. Partant de ce constat, nous avons testé l'efficacité de plusieurs molécules *in vitro* dans des cultures de fibroblastes embryonnaires humains, en raison de leur permissivité pour les souches virales de CMVH.

Le maribavir est un benzimidazole ayant un rôle anti-CMVH démontré. Sa CI_{50} est égale à 0,14 μ M dans des fibroblastes embryonnaires humains de poumons (Chou et al. 2006), mais la CI_{90} est parfois difficilement atteinte. Le maribavir est peu toxique pour les cellules et présente une bonne biodisponibilité, ce qui en fait une molécule de choix (Wang et al. 2003; Swan et al. 2007). Cette molécule est capable d'inhiber l'infection virale *in vitro*, *in vivo* et *in situ* (Lalezari et al. 2002; Winston et al. 2008) en se fixant au site catalytique de la phosphotransférase virale pUL97. Cette protéine joue un rôle clef dans la synthèse de l'ADN viral et dans l'export des capsides néoformées (Prichard et al. 1999; Wolf et al. 2001; Marschall et al. 2005). En revanche, son efficacité varie selon les cellules utilisées *in vitro* pour les essais antiviraux, suggérant une capacité de résistance intrinsèque de certains types cellulaires ou de certaines cellules au sein d'un tissu. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons d'une part testé l'association du MBV avec des inhibiteurs de Cdks agissant sur les mêmes voies que pUL97 et d'autre part, testé l'efficacité du MBV directement au sein d'un tissu composé de cellules très différentes et au métabolisme actif, le placenta.

La faible toxicité du maribavir est en effet un atout de cette molécule dans le traitement de l'infection congénitale ou sa prévention, sous réserve de son efficacité. Dans cette optique, nous avons choisi de l'associer avec d'autres molécules pour augmenter son activité antivirale. Le but de notre travail étant de découvrir des combinaisons thérapeutiques pouvant être administrées chez la femme enceinte, nous avons sélectionné des molécules faiblement toxiques et ayant déjà une activité anti-CMVH avérée. Nous avons choisi deux flavonoïdes, la baïcaléine et la quercétine et un antipaludéen, l'artésunate. Ces flavonoïdes inhibent les étapes très précoces du cycle viral, *via* leur action inhibitrice sur la voie de signalisation NFκB (Walker et al. 2000; Cotin et al. 2012). L'artésunate agit également sur la voie NFκB mais également sur deux autres voies de signalisation, SYK/PLCγ et PI3K/Akt. L'inhibition de ces voies de signalisation conduisent à l'apoptose des cellules infectées (Cheng et al.; Thanaketpaisarn et al.; Xu et al. 2007). Nous avons déterminé par essais antiviraux, la CI₅₀ de la quercétine (4,8 μM) et celle de la baïcaléine (0,36 μM). Ces molécules, administrées seules, ont également un fort pouvoir antiviral contre la souche clinique congénitale P*. Elles sont capables d'inhiber de plus de 90 % l'infection virale dans les fibroblastes embryonnaires humains : CI₉₀ (Quercétine) = 8,61 μM, CI₉₀ (Baïcaléine) = 3,93 μM. Lorsque ces molécules sont associées au maribavir, les CI₉₀ sont atteintes à une moindre concentration : MBV (5 μM) / Quercétine (2,4 μM) ; MBV (1 μM) / Baïcaléine (2,2 μM). L'artésunate a une action anti-AD169 *in vitro* dans des cultures de fibroblastes embryonnaires humains (CI₅₀ = 3,7 μM, (Kaptein et al. 2006) ; CI₅₀ = 5,8 μM (souche AD169-GFP), (Efferth et al. 2002)) ou d'astrocytes (lignée cellulaire U373, CI₅₀ = 2,22 μM, (Schnepf et al. 2010). Nos essais antiviraux confirment ces conclusions. Cette molécule est capable d'inhiber les souches AD169 et P* (*in vitro*, CI₅₀ de 0,62 et 1,17 μM pour les souches AD169 et P*, respectivement). Lorsqu'elle est administrée seule, la CI₉₀ n'est pas atteinte. En revanche, son association avec le maribavir augmente son efficacité anti-CMVH (CI₉₀ atteinte pour 0,25 μM artésunate / 5 μM maribavir contre l'AD169 et pour 0,25 μM artésunate / 1 μM maribavir contre la souche P*). Dans notre modèle *ex vivo*, l'artésunate (4 μM) réduit l'infection virale dans les villosités flottantes de moitié par rapport aux explants non traités et le maribavir de 4 fois (à 1 μM). En revanche, leur association n'améliore pas l'inhibition de l'infection. Bien que l'artésunate n'ait pas montré une véritable efficacité contre le virus RCMV chez le rat (Kaptein et al. 2006), il serait tout de même intéressant de le tester seul et en combinaison avec le maribavir dans notre modèle de souris humanisées, infectées par la souche congénitale P*.

Suite à la découverte d'un effet synergique entre le maribavir et la roscovitine *in vitro* (Chou et al. 2006), nous avons choisi de tester d'autres molécules anti-Cdks. Ces anti-Cdks agissent sur le cycle cellulaire et conduisent à l'apoptose des cellules. Sachant que la protéine virale pUL97 possède des similarités de structure avec la protéine Cdk2, nous nous sommes focalisés sur des anti-Cdks 2, bien que la plupart des molécules anti-Cdks n'agissent pas seulement sur la n°2. Parmi ces molécules, deux ont retenues notre attention, la roscovitine et l'AZD-5438 par leur effet inhibiteur sur la souche virale AD169 *in vitro*. Etonnamment, ces molécules présentent pas ou peu de toxicité cellulaire, suggérant leur utilisation thérapeutique chez la femme enceinte. En revanche, les molécules PHA-796 491 et le flavopiridol n'ont pas montré un effet anti-CMVH concluant. Lorsque ces molécules sont associées au maribavir, seules la roscovitine et l'AZD-5438 améliorent l'inhibition de l'infection virale. Le virus est complètement inhibé par les associations maribavir (20 μ M) / roscovitine (1 μ M) et maribavir (20 μ M) / AZD-5438 (20 nM), contrairement au maribavir seul qui n'est pas capable d'induire une inhibition de l'infection de 90 %. L'ensemble de ces résultats laisse supposer un effet bénéfique de la bithérapie anti-Cdks / maribavir contre l'infection à CMVH. En raison de leur faible toxicité cellulaire *in vitro*, il serait intéressant de tester l'efficacité antivirale de ces deux combinaisons thérapeutiques dans le modèle d'infection placentaire *ex vivo*, ainsi que dans d'autres types cellulaires ayant une permissivité pour le virus *in situ*, tels que les astrocytes ou les cellules endothéliales. Ces tests nous permettraient d'appréhender leur utilisation dans le cadre de maladies à CMVH touchant le système nerveux central au cours de l'infection congénitale ou chez les patients immunodéprimés.

Afin de compléter cette étude sur le potentiel de nouveaux antiviraux, nous avons voulu combiner l'effet antiviral de l'artésunate et de la baïcaléine, espérant obtenir une meilleure inhibition de l'infection par rapport à chaque molécule seule. Bien au contraire, les essais antiviraux réalisés sur les fibroblastes embryonnaires humains montrent une augmentation de l'infection lorsque les concentrations en artésunate et baïcaléine sont croissantes. Les résultats sont similaires dans le modèle d'explants *ex vivo*, suggérant un effet antagoniste des deux molécules. Sachant que ces traitements agissent sur la même cible I κ B- α , ces résultats soulèvent la question d'une compétition entre ces deux molécules ; une des deux molécules empêcherait ainsi à l'autre d'inhiber la phosphorylation d'I κ B- α et ainsi de devenir efficace contre l'infection.

Conclusion

Pour conclure, nos modèles d'infection *ex vivo* et *in vivo* ont permis d'étudier la cinétique de l'infection de deux souches, la souche de laboratoire AD169 et une souche clinique congénitale P*. Ces modèles semblent prometteurs pour l'étude de l'infection d'autres souches virales, et notamment des souches endothéliales (Merlin ou TEV1).

L'infection des explants de placentas de 1^{er} trimestre de grossesse, greffés en sous-musculaire chez la souris SCID doit être validée avant de tester des molécules thérapeutiques anti-CMVH. Il serait intéressant d'étudier des traitements prophylactiques *via* l'administration d'anticorps anti-CMVH neutralisants chez la souris, avant de les greffer avec du tissu placentaire infecté.

La viabilité des tissus placentaires pourraient être vérifiée au cours du temps post-greffe par marquage immunohistochimique *via* l'utilisation de marqueurs de prolifération (protéine Ki67) ou par western blot *via* la détection de marqueurs apoptotiques.

Nous avons testé l'efficacité antivirale de plusieurs molécules *in vitro*, un benzimidazole, le maribavir, deux flavonoïdes, la quercétine et la baïcaléine, un anti-paludéen, l'artésunate ainsi que des anti-Cdks, la roscovitine, le flavopiridol, l'AZD-5438 et le PHA-796 491. Les résultats observés sont très encourageants puisque ces molécules ont montré pour la plupart, une meilleure efficacité antivirale lorsqu'elles sont administrées en association. Ces molécules thérapeutiques présentent l'avantage d'être peu ou pas toxiques pour les cellules, suggérant leur utilisation chez la femme enceinte. Il serait intéressant de tester d'autres bithérapies : anti-Cdks (roscovitine et AZD-5438) / artésunate et anti-Cdks / baïcaléine *in vitro* et/ou *ex vivo*. Les inhibiteurs mTOR tels que l'évérolimus et le sirolimus qui présentent de fortes propriétés antivirales chez les patients transplantés (Vigano et al.; Hill et al. 2007; Marty et al. 2007; Ozaki et al. 2007; Demopoulos et al. 2008) pourraient probablement montrer une meilleure efficacité antivirale en association avec le maribavir, l'artésunate ou la baïcaléine, sachant que ces molécules n'agissent pas sur les mêmes cibles. En effet, l'évérolimus et le sirolimus agissent sur la voie de signalisation mTOR, une voie parallèle à la voie NFκB. Son inhibition conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Stepkowski 2003).

Nos modèles *ex vivo* et *in vivo* pourraient s'étendre à l'étude d'autres souches virales responsables d'infections congénitales malformatives tels que le parvovirus B19 ou le virus de la rubéole et de tester de nouvelles combinaisons thérapeutiques contre ces virus.

Références bibliographiques

- (2008a) A randomized, double-blind study to assess the efficacy and safety of prophylactic use of maribavir versus oral ganciclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in recipients of orthotopic liver transplants. Viropharm Inc.
- (2008b) A randomized, double-blind, placebo-controlled study to assess the efficacy and safety of prophylactic use of maribavir for the prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants. Viropharm Inc.
- Adler SP, Nigro G (2009) Findings and conclusions from CMV hyperimmune globulin treatment trials. *J Clin Virol* 46 Suppl 4: S54-57.
- Adler SP, Hempfling SH, Starr SE, Plotkin SA, Riddell S (1998) Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 17(3): 200-206.
- Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S (1999) Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. *Scand J Infect Dis* 31(5): 443-457.
- Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S (2001) Secondary maternal cytomegalovirus infection--A significant cause of congenital disease. *Pediatrics* 107(5): 1227-1228.
- Albrecht T, Fons MP, Boldogh I, AbuBakar S, Deng CZ et al. (1991) Metabolic and cellular effects of human cytomegalovirus infection. *Transplant Proc* 23(3 Suppl 3): 48-54, discussion 54-45.
- Alford CA, Stagno S, Pass RF, Britt WJ (1990) Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 7: S745-753.
- Allen LB, Li SX, Arnett G, Toyer B, Shannon WM et al. (1992) Novel method for evaluating antiviral drugs against human cytomegalovirus in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 36(1): 206-208.
- Altshuler G, McAdams AJ (1971) Cytomegalic inclusion disease of a nineteen-week fetus. Case report including a study of the placenta. *Am J Obstet Gynecol* 111(2): 295-298.
- Andrade MR, Yee J, Barry P, Spinner A, Roberts JA et al. (2003) Prevalence of antibodies to selected viruses in a long-term closed breeding colony of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in Brazil. *Am J Primatol* 59(3): 123-128.
- Asher DM, Gibbs CJ, Jr., Lang DJ, Gajdusek DC, Chanock RM (1974) Persistent shedding of cytomegalovirus in the urine of healthy Rhesus monkeys. *Proc Soc Exp Biol Med* 145(3): 794-801.
- Avery RK, Marty FM, Strasfeld L, Lee I, Arrieta A et al. Oral maribavir for treatment of refractory or resistant cytomegalovirus infections in transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 12(6): 489-496.
- Azam AZ, Vial Y, Fawer CL, Zufferey J, Hohlfeld P (2001) Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 97(3): 443-448.
- Barry PA, Lockridge KM, Salamat S, Tinling SP, Yue Y et al. (2006) Nonhuman primate models of intrauterine cytomegalovirus infection. *Ilar J* 47(1): 49-64.
- Beadle JR, Hartline C, Aldern KA, Rodriguez N, Harden E et al. (2002) Alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir exhibit multiple-log enhancement of antiviral activity against cytomegalovirus and herpesvirus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 46(8): 2381-2386.
- Becroft DM (1981) Prenatal cytomegalovirus infection: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Perspect Pediatr Pathol* 6: 203-241.
- Benedict CA, Butrovich KD, Lurain NS, Corbeil J, Rooney I et al. (1999) Cutting edge: a novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus. *J Immunol* 162(12): 6967-6970.
- Benirschke K (1990) The placenta in twin gestation. *Clin Obstet Gynecol* 33(1): 18-31.
- Bentz GL, Yurochko AD (2008) Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta1 and beta3 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(14): 5531-5536.
- Bernstein DI, Tepe ER, Mester JC, Arnold RL, Stanberry LR et al. (1999) Effects of DNA immunization formulated with bupivacaine in murine and guinea pig models of genital herpes simplex virus infection. *Vaccine* 17(15-16): 1964-1969.

- Bernstein DI, Schleiss MR, Berencsi K, Gonczol E, Dickey M et al. (2002) Effect of previous or simultaneous immunization with canarypox expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) on response to subunit gB vaccine plus MF59 in healthy CMV-seronegative adults. *J Infect Dis* 185(5): 686-690.
- Bia FJ, Miller SA, Davidson KH (1984a) The guinea pig cytomegalovirus model of congenital human cytomegalovirus infection. *Birth Defects Orig Artic Ser* 20(1): 233-241.
- Bia FJ, Griffith BP, Tarsio M, Hsiung GD (1980) Vaccination for the prevention of maternal and fetal infection with guinea pig cytomegalovirus. *J Infect Dis* 142(5): 732-738.
- Bia FJ, Griffith BP, Fong CK, Hsiung GD (1983) Cytomegaloviral infections in the guinea pig: experimental models for human disease. *Rev Infect Dis* 5(2): 177-195.
- Bia FJ, Miller SA, Lucia HL, Griffith BP, Tarsio M et al. (1984b) Vaccination against transplacental cytomegalovirus transmission: vaccine reactivation and efficacy in guinea pigs. *J Infect Dis* 149(3): 355-362.
- Bidanset DJ, Rybak RJ, Hartline CB, Kern ER (2001) Replication of human cytomegalovirus in severe combined immunodeficient mice implanted with human retinal tissue. *J Infect Dis* 184(2): 192-195.
- Bidanset DJ, Rybak RJ, Hartline CB, Kern ER (2004) Efficacy of ganciclovir and cidofovir against human cytomegalovirus replication in SCID mice implanted with human retinal tissue. *Antiviral Res* 63(1): 61-64.
- Biron KK (2006) Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res* 71(2-3): 154-163.
- Biron KK, Harvey RJ, Chamberlain SC, Good SS, Smith AA, 3rd et al. (2002) Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* 46(8): 2365-2372.
- Bischofberger N, Hitchcock MJ, Chen MS, Barkhimer DB, Cundy KC et al. (1994) 1-[(S)-2-hydroxy-2-oxo-1,4,2-dioxaphosphorinan-5-yl)methyl] cytosine, an intracellular prodrug for (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine with improved therapeutic index in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 38(10): 2387-2391.
- Biswas N, Sanchez V, Spector DH (2003) Human cytomegalovirus infection leads to accumulation of geminin and inhibition of the licensing of cellular DNA replication. *J Virol* 77(4): 2369-2376.
- Blanc WA (1978) Pathology of the placenta and cord in some viral infections. *Major Probl Clin Pediatr* 17: 237-258.
- Bodeus M, Hubinont C, Goubau P (1999) Increased risk of cytomegalovirus transmission in utero during late gestation. *Obstet Gynecol* 93(5 Pt 1): 658-660.
- Boehme KW, Guerrero M, Compton T (2006) Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol* 177(10): 7094-7102.
- Bogner E, Radsak K, Stinski MF (1998) The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol* 72(3): 2259-2264.
- Boldogh I, AbuBakar S, Millinoff D, Deng CZ, Albrecht T (1991) Cellular oncogene activation by human cytomegalovirus. Lack of correlation with virus infectivity and immediate early gene expression. *Arch Virol* 118(3-4): 163-177.
- Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF (1999) Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 104(1 Pt 1): 55-60.
- Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ (2001) Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 344(18): 1366-1371.
- Bourne N, Bravo FJ, Bernstein DI (2000) Cyclic HPMPC is safe and effective against systemic guinea pig cytomegalovirus infection in immune compromised animals. *Antiviral Res* 47(2): 103-109.
- Bourne N, Schleiss MR, Bravo FJ, Bernstein DI (2001) Preconception immunization with a cytomegalovirus (CMV) glycoprotein vaccine improves pregnancy outcome in a guinea pig model of congenital CMV infection. *J Infect Dis* 183(1): 59-64.

- Bratcher DF, Bourne N, Bravo FJ, Schleiss MR, Slaoui M et al. (1995) Effect of passive antibody on congenital cytomegalovirus infection in guinea pigs. *J Infect Dis* 172(4): 944-950.
- Bravo FJ, Cardin RD, Bernstein DI (2006) Effect of maternal treatment with cyclic HPMPC in the guinea pig model of congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 193(4): 591-597.
- Bravo FJ, Cardin RD, Bernstein DI (2007) A model of human cytomegalovirus infection in severe combined immunodeficient mice. *Antiviral Res* 76(2): 104-110.
- Bravo FJ, Bernstein DI, Beadle JR, Hostetler KY, Cardin RD (2011) Oral hexadecyloxypropyl-cidofovir therapy in pregnant guinea pigs improves outcome in the congenital model of cytomegalovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 55(1): 35-41.
- Bresnahan WA, Thompson EA, Albrecht T (1997) Human cytomegalovirus infection results in altered Cdk2 subcellular localization. *J Gen Virol* 78 (Pt 8): 1993-1997.
- Bresnahan WA, Boldogh I, Ma T, Albrecht T, Thompson EA (1996) Cyclin E/Cdk2 activity is controlled by different mechanisms in the G0 and G1 phases of the cell cycle. *Cell Growth Differ* 7(10): 1283-1290.
- Bresson JL, Clavequin MC, Mazon MC, Mengelle C, Scieux C et al. (2003) Risk of cytomegalovirus transmission by cryopreserved semen: a study of 635 semen samples from 231 donors. *Hum Reprod* 18(9): 1881-1886.
- Bruggeman CA, Engels W, Endert J (1987) Treatment of experimental cytomegalovirus infections with acyclovir. *Arch Virol* 97(1-2): 27-35.
- Buerger I, Reefschaeger J, Bender W, Eckenberg P, Popp A et al. (2001) A novel nonnucleoside inhibitor specifically targets cytomegalovirus DNA maturation via the UL89 and UL56 gene products. *J Virol* 75(19): 9077-9086.
- Buhles WC, Jr., Mastre BJ, Tinker AJ, Strand V, Koretz SH (1988) Ganciclovir treatment of life- or sight-threatening cytomegalovirus infection: experience in 314 immunocompromised patients. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 3: S495-506.
- Burton GJ, Watson AL (1997) The Structure of the Human Placenta: Implications for Initiating and Defending Against Virus Infections. *Rev Med Virol* 7(4): 219-228.
- Byth KF, Thomas A, Hughes G, Forder C, McGregor A et al. (2009) AZD5438, a potent oral inhibitor of cyclin-dependent kinases 1, 2, and 9, leads to pharmacodynamic changes and potent antitumor effects in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 8(7): 1856-1866.
- Camidge DR, Smethurst D, Growcott J, Barrass NC, Foster JR et al. (2007a) A first-in-man phase I tolerability and pharmacokinetic study of the cyclin-dependent kinase-inhibitor AZD5438 in healthy male volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol* 60(3): 391-398.
- Camidge DR, Pemberton M, Growcott J, Amakye D, Wilson D et al. (2007b) A phase I pharmacodynamic study of the effects of the cyclin-dependent kinase-inhibitor AZD5438 on cell cycle markers within the buccal mucosa, plucked scalp hairs and peripheral blood mononucleocytes of healthy male volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol* 60(4): 479-488.
- Cannon MJ (2009) Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol* 46 Suppl 4: S6-10.
- Casado JL, Arrizabalaga J, Montes M, Marti-Belda P, Tural C et al. (1999) Incidence and risk factors for developing cytomegalovirus retinitis in HIV-infected patients receiving protease inhibitor therapy. Spanish CMV-AIDS Study Group. *Aids* 13(12): 1497-1502.
- Cavanaugh VJ, Deng Y, Birkenbach MP, Slater JS, Campbell AE (2003) Vigorous innate and virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to murine cytomegalovirus in the submaxillary salivary gland. *J Virol* 77(3): 1703-1717.
- Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES et al. (1996) Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 70(1): 78-83.
- Chang WL, Tarantal AF, Zhou SS, Borowsky AD, Barry PA (2002) A recombinant rhesus cytomegalovirus expressing enhanced green fluorescent protein retains the wild-type phenotype and pathogenicity in fetal macaques. *J Virol* 76(18): 9493-9504.

- Chatterjee A, Harrison CJ, Britt WJ, Bewtra C (2001) Modification of maternal and congenital cytomegalovirus infection by anti-glycoprotein b antibody transfer in guinea pigs. *J Infect Dis* 183(11): 1547-1553.
- Chee MS, Satchwell SC, Preddie E, Weston KM, Barrell BG (1990) Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature* 344(6268): 774-777.
- Chen X, Kern ER, Drach JC, Gullen E, Cheng YC et al. (2003) Structure-activity relationships of (S,Z)-2-aminopurine methylenecyclopropane analogues of nucleosides. Variation of purine-6 substituents and activity against herpesviruses and hepatitis B virus. *J Med Chem* 46(8): 1531-1537.
- Cheng C, Ho WE, Goh FY, Guan SP, Kong LR et al. Anti-malarial drug artesunate attenuates experimental allergic asthma via inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *PLoS One* 6(6): e20932.
- Cheng C, Ho WE, Goh FY, Guan SP, Kong LR et al. (2011) Anti-malarial drug artesunate attenuates experimental allergic asthma via inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *PLoS One* 6(6): e20932.
- Choi YC, Swack NS, Hsiung GD (1978) Effect of heparin on cytomegalovirus replication. *Proc Soc Exp Biol Med* 157(4): 569-571.
- Chong AS, Huang W, Liu W, Luo J, Shen J et al. (1999) In vivo activity of leflunomide: pharmacokinetic analyses and mechanism of immunosuppression. *Transplantation* 68(1): 100-109.
- Chou S (2008) Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev Med Virol* 18(4): 233-246.
- Chou S (2009) Diverse cytomegalovirus UL27 mutations adapt to loss of viral UL97 kinase activity under maribavir. *Antimicrob Agents Chemother* 53(1): 81-85.
- Chou S, Van Wechel LC, Marousek GI (2006) Effect of cell culture conditions on the anticytomegalovirus activity of maribavir. *Antimicrob Agents Chemother* 50(7): 2557-2559.
- Chou S, Marousek GI, Senters AE, Davis MG, Biron KK (2004) Mutations in the human cytomegalovirus UL27 gene that confer resistance to maribavir. *J Virol* 78(13): 7124-7130.
- Chuang CC, Martinez K, Xie G, Kennedy A, Bumrungpert A et al. (2010) Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am J Clin Nutr* 92(6): 1511-1521.
- Chulay J, Biron K, Wang L, Underwood M, Chamberlain S et al. (1999) Development of novel benzimidazole riboside compounds for treatment of cytomegalovirus disease. *Adv Exp Med Biol* 458: 129-134.
- Cihlar T, Chen MS (1996) Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol Pharmacol* 50(6): 1502-1510.
- Colimon R, Minjolle S (2002) *Biologie du cytomegalovirus*; Elsevier Esem, editor. 3-14 p.
- Compton T (2004) Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol* 14(1): 5-8.
- Compton T, Nowlin DM, Cooper NR (1993) Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193(2): 834-841.
- Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E et al. (2003) Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 77(8): 4588-4596.
- Cotin S, Calliste CA, Mazeran MC, Hantz S, Duroux JL et al. (2012) Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication. *Antiviral Res* 96(2): 181-186.
- Covell WP (1932) The Occurrence of Intranuclear Inclusions in Monkeys Unaccompanied by Specific Signs of Disease. *Am J Pathol* 8(2): 151-158 151.
- Crough T, Khanna R (2009) Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 22(1): 76-98, Table of Contents.
- Crumpacker C, Marlowe S, Zhang JL, Abrams S, Watkins P (1988) Treatment of cytomegalovirus pneumonia. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 3: S538-546.

- Crumpacker CS (1992) Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am J Med* 92(2A): 3S-7S.
- Davis MG, Kenney SC, Kamine J, Pagano JS, Huang ES (1987) Immediate-early gene region of human cytomegalovirus trans-activates the promoter of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(23): 8642-8646.
- Dechanet J, Merville P, Berge F, Bone-Mane G, Taupin JL et al. (1999) Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis* 179(1): 1-8.
- Delale T, Paquin A, Asselin-Paturel C, Dalod M, Brizard G et al. (2005) MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J Immunol* 175(10): 6723-6732.
- Demopoulos L, Polinsky M, Steele G, Mines D, Blum M et al. (2008) Reduced risk of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients treated with sirolimus: a pooled analysis of clinical trials. *Transplant Proc* 40(5): 1407-1410.
- Devergie A, Traineau R, Esperou-Bourdeau H, Ribaud P, Socie G et al. (1994) Progress in the prevention of cytomegalovirus infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Nouv Rev Fr Hematol* 36 Suppl 1: S89-90.
- Dieterich DT, Chachoua A, Lafleur F, Worrell C (1988) Ganciclovir treatment of gastrointestinal infections caused by cytomegalovirus in patients with AIDS. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 3: S532-537.
- Dittmer D, Mocarski ES (1997) Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition. *J Virol* 71(2): 1629-1634.
- Dollard SC, Grosse SD, Ross DS (2007) New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 17(5): 355-363.
- Duncan AJ, Dummer JS, Paradis IL, Dauber JH, Yousem SA et al. (1991) Cytomegalovirus infection and survival in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 10(5 Pt 1): 638-644; discussion 645-636.
- Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJ et al. (2008) The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clin Infect Dis* 47(6): 804-811.
- Efferth T, Marschall M, Wang X, Huong SM, Hauber I et al. (2002) Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med (Berl)* 80(4): 233-242.
- Ettinger NA, Bailey TC, Trulock EP, Storch GA, Anderson D et al. (1993) Cytomegalovirus infection and pneumonitis. Impact after isolated lung transplantation. Washington University Lung Transplant Group. *Am Rev Respir Dis* 147(4): 1017-1023.
- Evers DL, Komazin G, Shin D, Hwang DD, Townsend LB et al. (2002) Interactions among antiviral drugs acting late in the replication cycle of human cytomegalovirus. *Antiviral Res* 56(1): 61-72.
- Evers DL, Chao CF, Wang X, Zhang Z, Huong SM et al. (2005) Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Res* 68(3): 124-134.
- Firan M, Bawdon R, Radu C, Ober RJ, Eaken D et al. (2001) The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of gamma-globulin in humans. *Int Immunol* 13(8): 993-1002.
- Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L (2000) Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol* 74(15): 6808-6820.
- Fishman JA (2007) Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 357(25): 2601-2614.
- Fong CK, Cohen SD, McCormick S, Hsiung GD (1987) Antiviral effect of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine against cytomegalovirus infection in a guinea pig model. *Antiviral Res* 7(1): 11-23.
- Fortunato EA, Spector DH (1998) p53 and RPA are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol* 72(3): 2033-2039.

- Fortunato EA, McElroy AK, Sanchez I, Spector DH (2000) Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* 8(3): 111-119.
- Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ et al. (1992) The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 326(10): 663-667.
- Fox DS, Schleiss MR (1997) Sequence and transcriptional analysis of the guinea pig cytomegalovirus UL97 homolog. *Virus Genes* 15(3): 255-264.
- Furman MH, Ploegh HL, Tortorella D (2002a) Membrane-specific, host-derived factors are required for US2- and US11-mediated degradation of major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem* 277(5): 3258-3267.
- Furman MH, Dey N, Tortorella D, Ploegh HL (2002b) The human cytomegalovirus US10 gene product delays trafficking of major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol* 76(22): 11753-11756.
- Gabrielli L, Losi L, Varani S, Lazzarotto T, Eusebi V et al. (2001) Complete replication of human cytomegalovirus in explants of first trimester human placenta. *J Med Virol* 64(4): 499-504.
- Gamadia LE, Rentenaar RJ, van Lier RA, ten Berge IJ (2004) Properties of CD4(+) T cells in human cytomegalovirus infection. *Hum Immunol* 65(5): 486-492.
- Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA et al. (2003) Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* 101(7): 2686-2692.
- Gandhi MK, Wills MR, Okecha G, Day EK, Hicks R et al. (2003) Late diversification in the clonal composition of human cytomegalovirus-specific CD8+ T cells following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 102(9): 3427-3438.
- Gentry BG, Kamil JP, Coen DM, Zemlicka J, Drach JC (2010) Stereoselective phosphorylation of cyclopropavir by pUL97 and competitive inhibition by maribavir. *Antimicrob Agents Chemother* 54(8): 3093-3098.
- Gibson W (1996) Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 39(5-6): 389-400.
- Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G (2002) Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist Updat* 5(2): 88-114.
- Gilbert MJ, Riddell SR, Li CR, Greenberg PD (1993) Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *J Virol* 67(6): 3461-3469.
- Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD (1996) Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383(6602): 720-722.
- Goekjian PG, Jirousek MR (1999) Protein kinase C in the treatment of disease: signal transduction pathways, inhibitors, and agents in development. *Curr Med Chem* 6(9): 877-903.
- Goff E, Griffith BP, Booss J (1987) Delayed amplification of cytomegalovirus infection in the placenta and maternal tissues during late gestation. *Am J Obstet Gynecol* 156(5): 1265-1270.
- Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Dionne CA, Kedersha NL et al. (1999) A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12536-12541.
- Goldner T, Hewlett G, Ettischer N, Ruebsamen-Schaeff H, Zimmermann H et al. (2011) The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (Letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *J Virol* 85(20): 10884-10893.
- Gonczol E, Plotkin S (2001) Development of a cytomegalovirus vaccine: lessons from recent clinical trials. *Expert Opin Biol Ther* 1(3): 401-412.
- Griffith BP, Hsiung GD (1980) Cytomegalovirus infection in guinea pigs. IV. Maternal infection at different stages of gestation. *J Infect Dis* 141(6): 787-793.
- Griffith BP, Askenase PW, Hsiung GD (1982) Serum and cell-mediated viral-specific delayed cutaneous basophil reactions during cytomegalovirus infection of guinea pigs. *Cell Immunol* 69(1): 138-149.

- Griffith BP, Isom HC, Lavalley JT (1990a) Cellular localization of cytomegalovirus nucleic acids in guinea pig salivary glands by in situ hybridization. *J Virol Methods* 27(2): 145-157.
- Griffith BP, Chen M, Isom HC (1990b) Role of primary and secondary maternal viremia in transplacental guinea pig cytomegalovirus transfer. *J Virol* 64(5): 1991-1997.
- Griffith BP, McCormick SR, Booss J, Hsiung GD (1986) Inbred guinea pig model of intrauterine infection with cytomegalovirus. *Am J Pathol* 122(1): 112-119.
- Griffith BP, McCormick SR, Fong CK, Lavalley JT, Lucia HL et al. (1985) The placenta as a site of cytomegalovirus infection in guinea pigs. *J Virol* 55(2): 402-409.
- Griffiths PD, Baboonian C (1984) A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report. *Br J Obstet Gynaecol* 91(4): 307-315.
- Griffiths PD, Stanton A, McCarrell E, Smith C, Osman M et al. (2012) Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 377(9773): 1256-1263.
- Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L et al. (2000) Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 183(2): 476-482.
- Hahn G, Jores R, Mocarski ES (1998) Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3937-3942.
- Halwachs-Baumann G, Wilders-Truschnig M, Desoye G, Hahn T, Kiesel L et al. (1998) Human trophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Virol* 72(9): 7598-7602.
- Hamilton ST, Scott G, Naing Z, Iwasenko J, Hall B et al. (2012) Human cytomegalovirus-induces cytokine changes in the placenta with implications for adverse pregnancy outcomes. *PLoS One* 7(12): e52899.
- Hamprecht K, Witzel S, Maschmann J, Speer CP, Jahn G (2000) Transmission of cytomegalovirus infection through breast milk in term and preterm infants. The role of cell free milk whey and milk cells. *Adv Exp Med Biol* 478: 231-239.
- Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP et al. (2001) Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* 357(9255): 513-518.
- Harborne JB (1986) Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res* 213: 15-24.
- Harborne JB (1988) Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. *Prog Clin Biol Res* 280: 17-27.
- Harrison CJ, Myers MG (1990) Relation of maternal CMV viremia and antibody response to the rate of congenital infection and intrauterine growth retardation. *J Med Virol* 31(3): 222-228.
- Harrison CJ, Britt WJ, Chapman NM, Mullican J, Tracy S (1995) Reduced congenital cytomegalovirus (CMV) infection after maternal immunization with a guinea pig CMV glycoprotein before gestational primary CMV infection in the guinea pig model. *J Infect Dis* 172(5): 1212-1220.
- Hartley JW, Rowe WP, Huebner RJ (1957) Serial propagation of the guinea pig salivary gland virus in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 96(2): 281-285.
- Heineman TC, Schleiss M, Bernstein DI, Spaete RR, Yan L et al. (2006) A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J Infect Dis* 193(10): 1350-1360.
- Hemmings DG, Kilani R, Nykiforuk C, Preiksaitis J, Guilbert LJ (1998) Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblasts. *J Virol* 72(6): 4970-4979.
- Hertel L, Chou S, Mocarski ES (2007) Viral and cell cycle-regulated kinases in cytomegalovirus-induced pseudomitosis and replication. *PLoS Pathog* 3(1): e6.
- Hill JA, Hummel M, Starling RC, Kobashigawa JA, Perrone SV et al. (2007) A lower incidence of cytomegalovirus infection in de novo heart transplant recipients randomized to everolimus. *Transplantation* 84(11): 1436-1442.
- Hindle E (1929) Filterable Viruses. *Proc R Soc Med* 22(6): 823-826.
- Hitchcock M, Jaffe J, Martin J, Stagg R (1996) Cidofovir, a new agent with potent anti-herpesvirus activity. *Antiviral Chem Chemother* 7: 115-127.

- Hokeness-Antonelli KL, Crane MJ, Dragoi AM, Chu WM, Salazar-Mather TP (2007) IFN- α -mediated inflammatory responses and antiviral defense in liver is TLR9-independent but MyD88-dependent during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 179(9): 6176-6183.
- Huff JL, Eberle R, Capitanio J, Zhou SS, Barry PA (2003) Differential detection of B virus and rhesus cytomegalovirus in rhesus macaques. *J Gen Virol* 84(Pt 1): 83-92.
- Humar A, Mazzulli T, Moussa G, Razonable RR, Paya CV et al. (2005) Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients. *Am J Transplant* 5(5): 1065-1070.
- Ichikawa N, Zhai YL, Shiozawa T, Toki T, Noguchi H et al. (1998) Immunohistochemical analysis of cell cycle regulatory gene products in normal trophoblast and placental site trophoblastic tumor. *Int J Gynecol Pathol* 17(3): 235-240.
- Isom HC (1979) Stimulation of ornithine decarboxylase by human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 42(2): 265-278.
- Jackson L (1920) *J Infect Dis* 26: 347.
- Jacobson MA (1997) Ganciclovir therapy for severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 25(6): 1487-1488.
- Jacobson MA, Wilson S, Stanley H, Holtzer C, Cherrington J et al. (1999) Phase I study of combination therapy with intravenous cidofovir and oral ganciclovir for cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 28(3): 528-533.
- Jarvis MA, Nelson JA (2007) Human cytomegalovirus tropism for endothelial cells: not all endothelial cells are created equal. *J Virol* 81(5): 2095-2101.
- Jault FM, Jault JM, Ruchti F, Fortunato EA, Clark C et al. (1995) Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol* 69(11): 6697-6704.
- Johari J, Kianmehr A, Mustafa MR, Abubakar S, Zandi K (2012) Antiviral Activity of Baicalein and Quercetin against the Japanese Encephalitis Virus. *Int J Mol Sci* 13(12): 16785-16795.
- John GT, Manivannan J, Chandy S, Peter S, Fleming DH et al. (2005) A prospective evaluation of leflunomide therapy for cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 37(10): 4303-4305.
- Johnson KP (1969) Mouse cytomegalovirus: placental infection. *J Infect Dis* 120(4): 445-450.
- Kalejta RF (2008) Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 72(2): 249-265, table of contents.
- Kalejta RF, Shenk T (2002) Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus. *Front Biosci* 7: d295-306.
- Kapasi AJ, Spector DH (2008) Inhibition of the cyclin-dependent kinases at the beginning of human cytomegalovirus infection specifically alters the levels and localization of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases cdk9 and cdk7 at the viral transcriptosome. *J Virol* 82(1): 394-407.
- Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D (2003) Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 79 Suppl 3: 1566-1570.
- Kaptein SJ, Efferth T, Leis M, Rechter S, Auerochs S et al. (2006) The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 69(2): 60-69.
- Keay S, Baldwin B (1992) The human fibroblast receptor for gp86 of human cytomegalovirus is a phosphorylated glycoprotein. *J Virol* 66(8): 4834-4838.
- Kenneson (2007) Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 17: 253.
- Kern ER, Rybak RJ, Hartline CB, Bidanset DJ (2001) Predictive efficacy of SCID-hu mouse models for treatment of human cytomegalovirus infections. *Antivir Chem Chemother* 12 Suppl 1: 149-156.
- Kern ER, Bidanset DJ, Hartline CB, Yan Z, Zemlicka J et al. (2004a) Oral activity of a methylenecyclopropane analog, cyclopropavir, in animal models for cytomegalovirus infections. *Antimicrob Agents Chemother* 48(12): 4745-4753.

- Kern ER, Collins DJ, Wan WB, Beadle JR, Hostetler KY et al. (2004b) Oral treatment of murine cytomegalovirus infections with ether lipid esters of cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother* 48(9): 3516-3522.
- Kern ER, Hartline CB, Rybak RJ, Drach JC, Townsend LB et al. (2004c) Activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides in animal models of cytomegalovirus infections. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5): 1749-1755.
- Kern ER, Kushner NL, Hartline CB, Williams-Aziz SL, Harden EA et al. (2005) In vitro activity and mechanism of action of methylenecyclopropane analogs of nucleosides against herpesvirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 49(3): 1039-1045.
- Kline JN, Hunninghake GM, He B, Monick MM, Hunninghake GW (1998) Synergistic activation of the human cytomegalovirus major immediate early promoter by prostaglandin E2 and cytokines. *Exp Lung Res* 24(1): 3-14.
- Komazin G, Ptak RG, Emmer BT, Townsend LB, Drach JC (2003) Resistance of human cytomegalovirus to the benzimidazole L-ribonucleoside maribavir maps to UL27. *J Virol* 77(21): 11499-11506.
- Kovacs A, Weber ML, Burns LJ, Jacob HS, Vercellotti GM (1996) Cytoplasmic sequestration of p53 in cytomegalovirus-infected human endothelial cells. *Am J Pathol* 149(5): 1531-1539.
- Krosky PM, Baek MC, Coen DM (2003) The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J Virol* 77(2): 905-914.
- Krosky PM, Underwood MR, Turk SR, Feng KW, Jain RK et al. (1998) Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. *J Virol* 72(6): 4721-4728.
- Kushner NL, Williams SL, Hartline CB, Harden EA, Bidanset DJ et al. (2003) Efficacy of methylenecyclopropane analogs of nucleosides against herpesvirus replication in vitro. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22(12): 2105-2119.
- Kutza AS, Muhl E, Hackstein H, Kirchner H, Bein G (1998) High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis* 26(5): 1076-1082.
- Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L et al. (2001) Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 184(5): 533-541.
- Lalezari JP (1997a) New treatment options for CMV retinitis in AIDS. *Adv Nurse Pract* 5(4): 45-49, 83.
- Lalezari JP (1997b) Cidofovir: a new therapy for cytomegalovirus retinitis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 14 Suppl 1: S22-26.
- Lalezari JP, Kuppermann BD (1997) Clinical experience with cidofovir in the treatment of cytomegalovirus retinitis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 14 Suppl 1: S27-31.
- Lalezari JP, Stagg RJ, Kuppermann BD, Holland GN, Kramer F et al. (1997) Intravenous cidofovir for peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 126(4): 257-263.
- Lalezari JP, Aberg JA, Wang LH, Wire MB, Miner R et al. (2002) Phase I dose escalation trial evaluating the pharmacokinetics, anti-human cytomegalovirus (HCMV) activity, and safety of 1263W94 in human immunodeficiency virus-infected men with asymptomatic HCMV shedding. *Antimicrob Agents Chemother* 46(9): 2969-2976.
- Lalezari JP, Drew WL, Glutzer E, James C, Miner D et al. (1995) (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine (cidofovir): results of a phase I/II study of a novel antiviral nucleotide analogue. *J Infect Dis* 171(4): 788-796.
- Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D (2003) The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 98(3): 269-297.
- Lau PK, Woods ML, Ratanjee SK, John GT Artesunate is ineffective in controlling valganciclovir-resistant cytomegalovirus infection. *Clin Infect Dis* 52(2): 279.
- Lazzarotto T, Gabrielli L, Foschini MP, Lanari M, Guerra B et al. (2003) Congenital cytomegalovirus infection in twin pregnancies: viral load in the amniotic fluid and pregnancy outcome. *Pediatrics* 112(2): e153-157.

- Lee SH, Zafer A, de Repentigny Y, Kothary R, Tremblay ML et al. (2003) Transgenic expression of the activating natural killer receptor Ly49H confers resistance to cytomegalovirus in genetically susceptible mice. *J Exp Med* 197(4): 515-526.
- Lembo D, Gribaudo G, Cavallo R, Riera L, Angeretti A et al. (1999) Human cytomegalovirus stimulates cellular dihydrofolate reductase activity in quiescent cells. *Intervirology* 42(1): 30-36.
- Li PC, Lam E, Roos WP, Zdzienicka MZ, Kaina B et al. (2008) Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair. *Cancer Res* 68(11): 4347-4351.
- Lischka P, Hewlett G, Wunberg T, Baumeister J, Paulsen D et al. (2010) In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrob Agents Chemother* 54(3): 1290-1297.
- Littler E, Stuart AD, Chee MS (1992) Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* 358(6382): 160-162.
- Lockridge KM, Sequer G, Zhou SS, Yue Y, Mandell CP et al. (1999) Pathogenesis of experimental rhesus cytomegalovirus infection. *J Virol* 73(11): 9576-9583.
- London WT, Martinez AJ, Houff SA, Wallen WC, Curfman BL et al. (1986) Experimental congenital disease with simian cytomegalovirus in rhesus monkeys. *Teratology* 33(3): 323-331.
- Lopez H, Benard M, Saint-Aubert E, Baron M, Martin H et al. (2011) Novel model of placental tissue explants infected by cytomegalovirus reveals different permissiveness in early and term placentae and inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Placenta* 32(7): 522-530.
- Lowance D, Neumayer HH, Legendre CM, Squifflet JP, Kovarik J et al. (1999) Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N Engl J Med* 340(19): 1462-1470.
- Lu M, Shenk T (1999) Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle. *J Virol* 73: 676-683.
- Luo MH, Schwartz PH, Fortunato EA (2008) Neonatal neural progenitor cells and their neuronal and glial cell derivatives are fully permissive for human cytomegalovirus infection. *J Virol* 82(20): 9994-10007.
- Lurain NS, Chou S Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 23(4): 689-712.
- Lurain NS, Chou S (2010) Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 23(4): 689-712.
- Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Tabata T, Pereira L (2006) Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Am J Pathol* 168(4): 1210-1226.
- Margulies BJ, Browne H, Gibson W (1996) Identification of the human cytomegalovirus G protein-coupled receptor homologue encoded by UL33 in infected cells and enveloped virus particles. *Virology* 225(1): 111-125.
- Markham FS, Hudson NP (1936) Susceptibility of the Guinea Pig Fetus to the Submaxillary Gland Virus of Guinea Pigs. *Am J Pathol* 12(2): 175-182 171.
- Marschall M, Stein-Gerlach M, Freitag M, Kupfer R, van Den Bogaard M et al. (2001) Inhibitors of human cytomegalovirus replication drastically reduce the activity of the viral protein kinase pUL97. *J Gen Virol* 82(Pt 6): 1439-1450.
- Marschall M, Freitag M, Suchy P, Romaker D, Kupfer R et al. (2003) The protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44. *Virology* 311(1): 60-71.
- Marschall M, Marzi A, aus dem Siepen P, Jochmann R, Kalmer M et al. (2005) Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina. *J Biol Chem* 280(39): 33357-33367.
- Marshall GS, Rabalais GP, Stout GG, Waldeyer SL (1992) Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *J Infect Dis* 165(2): 381-384.

- Marty FM, Bryar J, Browne SK, Schwarzberg T, Ho VT et al. (2007) Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis protects against cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a cohort analysis. *Blood* 110(2): 490-500.
- Matthews T, Boehme R (1988) Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 3: S490-494.
- Mayaud C, Parrot A, Cadranet J (1999) Cytomégalovirus : clinique chez l'immunodéprimé; In Maréchal V SM, Nicolas JC, editor. Paris: Elsevier.
- McCutchan JA (1995) Clinical impact of cytomegalovirus infections of the nervous system in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 21 Suppl 2: S196-201.
- McDonagh S, Maidji E, Chang HT, Pereira L (2006) Patterns of human cytomegalovirus infection in term placentas: a preliminary analysis. *J Clin Virol* 35(2): 210-215.
- McGregor A, Choi KY (2011) Cytomegalovirus antivirals and development of improved animal models. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7(10): 1245-1265.
- McGregor A, Choi KY, Cui X, McVoy MA, Schleiss MR (2008) Expression of the human cytomegalovirus UL97 gene in a chimeric guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) results in viable virus with increased susceptibility to ganciclovir and maribavir. *Antiviral Res* 78(3): 250-259.
- McSharry JJ, McDonough A, Olson B, Hallenberger S, Reefschlaeger J et al. (2001) Susceptibilities of human cytomegalovirus clinical isolates to BAY38-4766, BAY43-9695, and ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother* 45(10): 2925-2927.
- Meir (2005) Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. *J Clin Microbiol* 43: 1318-1324.
- Mendel DB, Cihlar T, Moon K, Chen MS (1997) Conversion of 1-[[[(S)-2-hydroxy-2-oxo-1,4,2-dioxaphosphorinan-5-yl)methyl]cytosine to cidofovir by an intracellular cyclic CMP phosphodiesterase. *Antimicrob Agents Chemother* 41(3): 641-646.
- Mengelle C, Pasquier C, Rostaing L, Sandres-Saune K, Puel J et al. (2003) Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J Med Virol* 69(2): 225-231.
- Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH (1998) Roscovitine inhibits the proliferative activity of immortal and neoplastic human breast epithelial cells. *Anticancer Res* 18(2A): 751-755.
- Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J (2009) The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia* 11(1): 1-9.
- Miller DM, Zhang Y, Rahill BM, Waldman WJ, Sedmak DD (1999) Human cytomegalovirus inhibits IFN- α -stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN- α signal transduction. *J Immunol* 162(10): 6107-6113.
- Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE et al. (1998) Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med* 187(5): 675-683.
- Mocarski ES, Bonyhadi M, Salimi S, McCune JM, Kaneshima H (1993) Human cytomegalovirus in a SCID-hu mouse: thymic epithelial cells are prominent targets of viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(1): 104-108.
- Mocarsky, Courcelle (2001) Cytomegalovirus and their replication.; Virology F, editor. 2629-2673 p.
- Montagnoli A, Valsasina B, Croci V, Menichincheri M, Rainoldi S et al. (2008) A Cdc7 kinase inhibitor restricts initiation of DNA replication and has antitumor activity. *Nat Chem Biol* 4(6): 357-365.
- Muhlemann K, Miller RK, Metlay L, Menegus MA (1992) Cytomegalovirus infection of the human placenta: an immunocytochemical study. *Hum Pathol* 23(11): 1234-1237.
- Mutimer D, Mirza D, Shaw J, O'Donnell K, Elias E (1997) Enhanced (cytomegalovirus) viral replication associated with septic bacterial complications in liver transplant recipients. *Transplantation* 63(10): 1411-1415.
- Nakamura Y, Sakuma S, Ohta Y, Kawano K, Hashimoto T (1994) Detection of the human cytomegalovirus gene in placental chronic villitis by polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 25(8): 815-818.

- Nassiri MR, Emerson SG, Devivar RV, Townsend LB, Drach JC et al. (1996) Comparison of benzimidazole nucleosides and ganciclovir on the in vitro proliferation and colony formation of human bone marrow progenitor cells. *Br J Haematol* 93(2): 273-279.
- Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J et al. (1993) Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 197(1): 143-158.
- Nelson CT, Demmler GJ (1997) Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus, and newborn infant. *Clin Perinatol* 24(1): 151-160.
- Nigro G, Adler SP, Parruti G, Anceschi MM, Coclite E et al. (2011) Immunoglobulin therapy of fetal cytomegalovirus infection occurring in the first half of pregnancy--a case-control study of the outcome in children. *J Infect Dis* 205(2): 215-227.
- Ninomiya T, Takimoto H, Matsuzaki G, Hamano S, Yoshida H et al. (2000) Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. *Immunology* 99(2): 187-194.
- Nixon DE, McVoy MA (2004) Dramatic effects of 2-bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole riboside on the genome structure, packaging, and egress of guinea pig cytomegalovirus. *J Virol* 78(4): 1623-1635.
- Numazaki K, Chiba S (1997) Current aspects of diagnosis and treatment of cytomegalovirus infections in infants. *Clin Diagn Virol* 8(3): 169-181.
- Odeberg J, Plachter B, Branden L, Soderberg-Naucler C (2003) Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain. *Blood* 101(12): 4870-4877.
- Ozaki KS, Camara NO, Nogueira E, Pereira MG, Granato C et al. (2007) The use of sirolimus in ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 21(5): 675-680.
- Pass RF (2009) Development and evidence for efficacy of CMV glycoprotein B vaccine with MF59 adjuvant. *J Clin Virol* 46 Suppl 4: S73-76.
- Pass RF, Hutto C (1986) Group day care and cytomegaloviral infections of mothers and children. *Rev Infect Dis* 8(4): 599-605.
- Pass RF, Stagno S, Dworsky ME, Smith RJ, Alford CA (1982) Excretion of cytomegalovirus in mothers: observations after delivery of congenitally infected and normal infants. *J Infect Dis* 146(1): 1-6.
- Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W et al. (2009) Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 360(12): 1191-1199.
- Patel V, Senderowicz AM, Pinto D, Jr., Igishi T, Raffeld M et al. (1998) Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis. *J Clin Invest* 102(9): 1674-1681.
- Peckham CS (1989) Cytomegalovirus in the neonate. *J Antimicrob Chemother* 23 Suppl E: 17-21.
- Peckham CS, Stark O, Dudgeon JA, Martin JA, Hawkins G (1987) Congenital cytomegalovirus infection: a cause of sensorineural hearing loss. *Arch Dis Child* 62(12): 1233-1237.
- Pepperl S, Munster J, Mach M, Harris JR, Plachter B (2000) Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol* 74(13): 6132-6146.
- Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Tabata T (2005) Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol* 13(4): 164-174.
- Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Fisher S (2003) Human cytomegalovirus transmission from the uterus to the placenta correlates with the presence of pathogenic bacteria and maternal immunity. *J Virol* 77(24): 13301-13314.
- Peterlin BM, Price DH (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23(3): 297-305.
- Pindur U, Kim YS, Mehrabani F (1999) Advances in indolo[2,3-a]carbazole chemistry: design and synthesis of protein kinase C and topoisomerase I inhibitors. *Curr Med Chem* 6(1): 29-69.

- Plachter B, Sinzger C, Jahn G (1996) Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* 46: 195-261.
- Plotkin SA (1999) Cytomegalovirus vaccine. *Am Heart J* 138(5 Pt 2): S484-487.
- Plotkin SA (2001) Vaccination against cytomegalovirus. *Arch Virol Suppl*(17): 121-134.
- Polis MA, Masur H (1995) Promising new treatments for cytomegalovirus retinitis. *Jama* 273(18): 1457-1459.
- Prichard MN, Britt WJ, Daily SL, Hartline CB, Kern ER (2005) Human cytomegalovirus UL97 Kinase is required for the normal intranuclear distribution of pp65 and virion morphogenesis. *J Virol* 79(24): 15494-15502.
- Prichard MN, Quenelle DC, Bidanset DJ, Komazin G, Chou S et al. (2006) Human cytomegalovirus UL27 is not required for viral replication in human tissue implanted in SCID mice. *Virol J* 3: 18.
- Prichard MN, Gao N, Jairath S, Mulamba G, Krosky P et al. (1999) A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *J Virol* 73(7): 5663-5670.
- Prosch S, Staak K, Stein J, Liebenthal C, Stamminger T et al. (1995) Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNF α is mediated via induction of NF- κ B. *Virology* 208(1): 197-206.
- Prosch S, Wendt CE, Reinke P, Priemer C, Oppert M et al. (2000) A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 272(2): 357-365.
- Qiu YL, Ptak RG, Breitenbach JM, Lin JS, Cheng YC et al. (1998a) (Z)- and (E)-2-(hydroxymethylcyclopropylidene)-methylpurines and pyrimidines as antiviral agents. *Antivir Chem Chemother* 9(4): 341-352.
- Qiu YL, Hempel A, Camerman N, Camerman A, Geiser F et al. (1998b) (R)-(-)- and (S)-(+)-Synadenol: synthesis, absolute configuration, and enantioselectivity of antiviral effect. *J Med Chem* 41(26): 5257-5264.
- Rahav G, Gabbay R, Ornoy A, Shechtman S, Arnon J et al. (2007) Primary versus nonprimary cytomegalovirus infection during pregnancy, Israel. *Emerg Infect Dis* 13(11): 1791-1793.
- Ramsay ME, Miller E, Peckham CS (1991) Outcome of confirmed symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child* 66(9): 1068-1069.
- Rasmussen L, Matkin C, Spaete R, Pacht C, Merigan TC (1991) Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J Infect Dis* 164(5): 835-842.
- Razonable RR Innate immune genetic profile to predict infection risk and outcome after liver transplant. *Hepatology* 52(3): 814-817.
- Razonable RR, Emery VC (2004) Management of CMV infection and disease in transplant patients. 27-29 February 2004. *Herpes* 11(3): 77-86.
- Rechter S, Scott GM, Eickhoff J, Zielke K, Auerochs S et al. (2009) Cyclin-dependent Kinases Phosphorylate the Cytomegalovirus RNA Export Protein pUL69 and Modulate Its Nuclear Localization and Activity. *J Biol Chem* 284(13): 8605-8613.
- Reddehase MJ, Weiland F, Munch K, Jonjic S, Luske A et al. (1985) Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol* 55(2): 264-273.
- Reefschlaeger J, Bender W, Hallenberger S, Weber O, Eckenberg P et al. (2001) Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. *J Antimicrob Chemother* 48(6): 757-767.
- Revello MG, Gerna G (2004) Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 29(2): 71-83.
- Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Lilleri D, Gorini G et al. (2002) Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. *J Infect Dis* 186(4): 553-557.

- Reyburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Pazmany L et al. (1997) The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 386(6624): 514-517.
- Reynolds DW, Stagno S, Hosty TS, Tiller M, Alford CA, Jr. (1973) Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med* 289(1): 1-5.
- Robain M, Carre N, Salmon-Ceron D, Dussaix E, Meyer L (1998) [Prevalence and incidence of cytomegalovirus infection in patients infected with HIV-1. SEROCO group]. *Presse Med* 27(20): 949-953.
- Robain M, Boufassa F, Hubert JB, Persoz A, Burgard M et al. (2001) Cytomegalovirus seroconversion as a cofactor for progression to AIDS. *Aids* 15(2): 251-256.
- Rybak RJ, Zemlicka J, Qiu YL, Hartline CB, Kern ER (1999) Effective treatment of murine cytomegalovirus infections with methylenecyclopropane analogues of nucleosides. *Antiviral Res* 43(3): 175-188.
- Rybak RJ, Hartline CB, Qiu YL, Zemlicka J, Harden E et al. (2000) In vitro activities of methylenecyclopropane analogues of nucleosides and their phosphoralaninate prodrugs against cytomegalovirus and other herpesvirus infections. *Antimicrob Agents Chemother* 44(6): 1506-1511.
- Sachdev R, Nuovo GJ, Kaplan C, Greco MA (1990) In situ hybridization analysis for cytomegalovirus in chronic villitis. *Pediatr Pathol* 10(6): 909-917.
- Safrin S, Cherrington J, Jaffe HS (1997) Clinical uses of cidofovir. *Rev Med Virol* 7(3): 145-156.
- Salvant BS, Fortunato EA, Spector DH (1998) Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J Virol* 72(5): 3729-3741.
- Sanchez V, Spector DH (2006) Cyclin-dependent kinase activity is required for efficient expression and posttranslational modification of human cytomegalovirus proteins and for production of extracellular particles. *J Virol* 80(12): 5886-5896.
- Sanchez V, Sztul E, Britt WJ (2000) Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J Virol* 74(8): 3842-3851.
- Sanchez V, McElroy AK, Spector DH (2003) Mechanisms governing maintenance of Cdk1/cyclin B1 kinase activity in cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol* 77(24): 13214-13224.
- Sanchez V, McElroy AK, Yen J, Tamrakar S, Clark CL et al. (2004) Cyclin-dependent kinase activity is required at early times for accurate processing and accumulation of the human cytomegalovirus UL122-123 and UL37 immediate-early transcripts and at later times for virus production. *J Virol* 78(20): 11219-11232.
- Schang LM, St Vincent MR, Lacasse JJ (2006) Five years of progress on cyclin-dependent kinases and other cellular proteins as potential targets for antiviral drugs. *Antivir Chem Chemother* 17(6): 293-320.
- Schleiss MR (2006) Nonprimate models of congenital cytomegalovirus (CMV) infection: gaining insight into pathogenesis and prevention of disease in newborns. *Ilar J* 47(1): 65-72.
- Schleiss MR (2008) Comparison of vaccine strategies against congenital CMV infection in the guinea pig model. *J Clin Virol* 41(3): 224-230.
- Schleiss MR, Bourne N, Jensen NJ, Bravo F, Bernstein DI (2000) Immunogenicity evaluation of DNA vaccines that target guinea pig cytomegalovirus proteins glycoprotein B and UL83. *Viral Immunol* 13(2): 155-167.
- Schleiss MR, Bourne N, Bravo FJ, Jensen NJ, Bernstein DI (2003) Quantitative-competitive PCR monitoring of viral load following experimental guinea pig cytomegalovirus infection. *J Virol Methods* 108(1): 103-110.
- Schleiss MR, Bourne N, Stroup G, Bravo FJ, Jensen NJ et al. (2004) Protection against congenital cytomegalovirus infection and disease in guinea pigs, conferred by a purified recombinant glycoprotein B vaccine. *J Infect Dis* 189(8): 1374-1381.

- Schnepf N, Corvo J, Pors MJ, Mazon MC (2010) Antiviral activity of ganciclovir and artesunate towards human cytomegalovirus in astrocytoma cells. *Antiviral Res* 89(2): 186-188.
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182(3): 311-322.
- Sciammas R, Kodukula P, Tang Q, Hendricks RL, Bluestone JA (1997) T cell receptor-gamma/delta cells protect mice from herpes simplex virus type 1-induced lethal encephalitis. *J Exp Med* 185(11): 1969-1975.
- Segondy M, Salhi L (1995) IgG, IgM and IgA antibody responses against immediate-early, early and late human cytomegalovirus proteins in patients with HCMV infections. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 7: 121-128.
- Shenk TE, Stinski MF (2008) Human cytomegalovirus. Preface. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: v.
- Simister NE, Story CM, Chen HL, Hunt JS (1996) An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol* 26(7): 1527-1531.
- Sinclair J, Sissons P (1996) Latent and persistent infections of monocytes and macrophages. *Intervirology* 39(5-6): 293-301.
- Sinzger C, Jahn G (1996) Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 39(5-6): 302-319.
- Sinzger C, Muntefering H, Loning T, Stoss H, Plachter B et al. (1993) Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423(4): 249-256.
- Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES et al. (2001) A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14): 7829-7834.
- Smith ME, Cimica V, Chinni S, Challagulla K, Mani S et al. (2008) Rhabdoid tumor growth is inhibited by flavopiridol. *Clin Cancer Res* 14(2): 523-532.
- Snoeck R, De Clercq E (2002) Role of cidofovir in the treatment of DNA virus infections, other than CMV infections, in immunocompromised patients. *Curr Opin Investig Drugs* 3(11): 1561-1566.
- Snoeck R, Sakuma T, De Clercq E, Rosenberg I, Holy A (1988) (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 32(12): 1839-1844.
- Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA (1997) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J Clin Invest* 100(12): 3154-3163.
- Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS (2008) Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* 455(7211): 391-395.
- Spaete RR, Mocarski ES (1985) Regulation of cytomegalovirus gene expression: alpha and beta promoters are trans activated by viral functions in permissive human fibroblasts. *J Virol* 56(1): 135-143.
- Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford CA (1980) Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 302(19): 1073-1076.
- Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Britt WJ, Alford CA (1984) Congenital and perinatal cytomegalovirus infections: clinical characteristics and pathogenic factors. *Birth Defects Orig Artic Ser* 20(1): 65-85.
- Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moore EG et al. (1982) Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N Engl J Med* 306(16): 945-949.
- Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE et al. (1986) Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *Jama* 256(14): 1904-1908.
- Stals FS, de Clercq E, Bruggeman CA (1991) Comparative activity of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine against rat cytomegalovirus infection in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 35(11): 2262-2266.

- Stals FS, Zeytinoglu A, Havenith M, de Clercq E, Bruggeman CA (1993) Rat cytomegalovirus-induced pneumonitis after allogeneic bone marrow transplantation: effective treatment with (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)cytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 37(2): 218-223.
- Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF et al. (2006) Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis* 43(9): 1143-1151.
- Stein J, Volk HD, Liebenthal C, Kruger DH, Prosch S (1993) Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J Gen Virol* 74 (Pt 11): 2333-2338.
- Stepkowski SM (2003) Preclinical results of sirolimus treatment in transplant models. *Transplant Proc* 35(3 Suppl): 219S-226S.
- Stewart FW, Rhoads CP (1929) Intradermal Versus Subcutaneous Immunization of Monkeys against Poliomyelitis. *J Exp Med* 49(6): 959-973.
- Strasfeld L, Lee I, Tatarowicz W, Villano S, Chou S Virologic characterization of multidrug-resistant cytomegalovirus infection in 2 transplant recipients treated with maribavir. *J Infect Dis* 202(1): 104-108.
- Sudarsanam TD, Sahni RD, John GT (2006) Leflunomide: a possible alternative for ganciclovir sensitive and resistant cytomegalovirus infections. *Postgrad Med J* 82(967): 313-314.
- Swan SK, Smith WB, Marbury TC, Schumacher M, Dougherty C et al. (2007) Pharmacokinetics of maribavir, a novel oral anticytomegalovirus agent, in subjects with varying degrees of renal impairment. *J Clin Pharmacol* 47(2): 209-217.
- Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K et al. (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10): 3516-3521.
- Tamrakar S, Kapasi AJ, Spector DH (2005) Human cytomegalovirus infection induces specific hyperphosphorylation of the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II that is associated with changes in the abundance, activity, and localization of cdk9 and cdk7. *J Virol* 79(24): 15477-15493.
- Tarantal AF, Salamat MS, Britt WJ, Luciw PA, Hendrickx AG et al. (1998) Neuropathogenesis induced by rhesus cytomegalovirus in fetal rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Infect Dis* 177(2): 446-450.
- Thanaketaipaisarn O, Waiwut P, Sakurai H, Saiki I Artesunate enhances TRAIL-induced apoptosis in human cervical carcinoma cells through inhibition of the NF-kappaB and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol* 39(1): 279-285.
- Theiler RN, Compton T (2001) Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O. *J Biol Chem* 276(42): 39226-39231.
- Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP et al. (2000) Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287(5455): 1031.
- Townsend LB, Devivar RV, Turk SR, Nassiri MR, Drach JC (1995) Design, synthesis, and antiviral activity of certain 2,5,6-trihalo-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazoles. *J Med Chem* 38(20): 4098-4105.
- Underwood MR, Harvey RJ, Stanat SC, Hemphill ML, Miller T et al. (1998) Inhibition of human cytomegalovirus DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product. *J Virol* 72(1): 717-725.
- Underwood MR, Ferris RG, Selleseth DW, Davis MG, Drach JC et al. (2004) Mechanism of action of the ribopyranoside benzimidazole GW275175X against human cytomegalovirus. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5): 1647-1651.
- Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ et al. (2004) Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 78(20): 10960-10966.

- Vigano M, Dengler T, Mattei MF, Poncelet A, Vanhaecke J et al. Lower incidence of cytomegalovirus infection with everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo cardiac transplant recipients: a randomized, multicenter study. *Transpl Infect Dis* 12(1): 23-30.
- Vochem M, Hamprecht K, Jahn G, Speer CP (1998) Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Pediatr Infect Dis J* 17(1): 53-58.
- Vogel P, Weigler BJ, Kerr H, Hendrickx AG, Barry PA (1994) Seroepidemiologic studies of cytomegalovirus infection in a breeding population of rhesus macaques. *Lab Anim Sci* 44(1): 25-30.
- Voigt V, Forbes CA, Tonkin JN, Degli-Esposti MA, Smith HR et al. (2003) Murine cytomegalovirus m157 mutation and variation leads to immune evasion of natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13483-13488.
- Wagstaff AJ, Bryson HM (1994) Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. *Drugs* 48(2): 199-226.
- Wakuda K, Yoshida Y (1992) DNA ploidy and proliferative characteristics of human trophoblasts. *Acta Obstet Gynecol Scand* 71(1): 12-16.
- Waldman WJ, Knight DA, Lurain NS, Miller DM, Sedmak DD et al. (1999a) Novel mechanism of inhibition of cytomegalovirus by the experimental immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation* 68(6): 814-825.
- Waldman WJ, Knight DA, Blinder L, Shen J, Lurain NS et al. (1999b) Inhibition of cytomegalovirus in vitro and in vivo by the experimental immunosuppressive agent leflunomide. *Intervirology* 42(5-6): 412-418.
- Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT et al. (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* 6(4): 909-919.
- Walmsley SL, Chew E, Read SE, Vellend H, Salit I et al. (1988) Treatment of cytomegalovirus retinitis with trisodium phosphonoformate hexahydrate (Foscarnet). *J Infect Dis* 157(3): 569-572.
- Wang D, Shenk T (2005) Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(50): 18153-18158.
- Wang LH, Peck RW, Yin Y, Allanson J, Wiggs R et al. (2003) Phase I safety and pharmacokinetic trials of 1263W94, a novel oral anti-human cytomegalovirus agent, in healthy and human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 47(4): 1334-1342.
- Weber O, Bender W, Eckenberg P, Goldmann S, Haerter M et al. (2001) Inhibition of murine cytomegalovirus and human cytomegalovirus by a novel non-nucleosidic compound in vivo. *Antiviral Res* 49(3): 179-189.
- Weisblum Y, Panet A, Zakay-Rones Z, Haimov-Kochman R, Goldman-Wohl D et al. (2011) Modeling of human cytomegalovirus maternal-fetal transmission in a novel decidual organ culture. *J Virol* 85(24): 13204-13213.
- White DR, Choo DI, Stroup G, Schleiss MR (2006) The effect of cidofovir on cytomegalovirus-induced hearing loss in a Guinea pig model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132(6): 608-615.
- Wiebusch L, Uecker R, Hagemeyer C (2003) Human cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting MCM loading onto chromatin. *EMBO Rep* 4(1): 42-46.
- Williams-Aziz SL, Hartline CB, Harden EA, Daily SL, Prichard MN et al. (2005) Comparative activities of lipid esters of cidofovir and cyclic cidofovir against replication of herpesviruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 49(9): 3724-3733.
- Williams SL, Hartline CB, Kushner NL, Harden EA, Bidanset DJ et al. (2003) In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 47(7): 2186-2192.
- Williamson WD, Desmond MM, LaFevers N, Taber LH, Catlin FI et al. (1982) Symptomatic congenital cytomegalovirus. Disorders of language, learning, and hearing. *Am J Dis Child* 136(10): 902-905.

- Winston DJ, Young JA, Pullarkat V, Papanicolaou GA, Vij R et al. (2008) Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant recipients: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Blood* 111(11): 5403-5410.
- Wolf DG, Yaniv I, Ashkenazi S, Honigman A (2001) Emergence of multiple human cytomegalovirus ganciclovir-resistant mutants with deletions and substitutions within the UL97 gene in a patient with severe combined immunodeficiency. *Antimicrob Agents Chemother* 45(2): 593-595.
- Wolf DG, Shimoni A, Resnick IB, Stamminger T, Neumann AU et al. (2011) Human cytomegalovirus kinetics following institution of artesunate after hematopoietic stem cell transplantation. *Antiviral Res* 90(3): 183-186.
- Woolf NK (1990) Experimental congenital cytomegalovirus labyrinthitis and sensorineural hearing loss. *Am J Otolaryngol* 11(5): 299-303.
- Woolf NK, Koehn FJ, Harris JP, Richman DD (1989) Congenital cytomegalovirus labyrinthitis and sensorineural hearing loss in guinea pigs. *J Infect Dis* 160(6): 929-937.
- Woolf NK, Ochi JW, Silva EJ, Sharp PA, Harris JP et al. (1988) Ganciclovir prophylaxis for cochlear pathophysiology during experimental guinea pig cytomegalovirus labyrinthitis. *Antimicrob Agents Chemother* 32(6): 865-872.
- Xu H, He Y, Yang X, Liang L, Zhan Z et al. (2007) Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF- α -induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF- κ B and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* 46(6): 920-926.
- Yamada S, Kosugi I, Katano H, Fukui Y, Kawasaki H et al. In vivo imaging assay for the convenient evaluation of antiviral compounds against cytomegalovirus in mice. *Antiviral Res* 88(1): 45-52.
- Yecies D, Carlson NE, Deng J, Letai A Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* 115(16): 3304-3313.
- Yurochko AD, Hwang ES, Rasmussen L, Keay S, Pereira L et al. (1997) The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF- κ B during infection. *J Virol* 71(7): 5051-5059.
- Zamora MR (2004) Cytomegalovirus and lung transplantation. *Am J Transplant* 4(8): 1219-1226.
- Zarkowska T, Mitnacht S (1997) Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 272(19): 12738-12746.
- Zarkowska T, U S, Harlow E, Mitnacht S (1997) Monoclonal antibodies specific for underphosphorylated retinoblastoma protein identify a cell cycle regulated phosphorylation site targeted by CDKs. *Oncogene* 14(2): 249-254.
- Zhou S, Zemlicka J, Kern ER, Drach JC (2007) Fluoroanalogues of anti-cytomegalovirus agent cyclopropavir: synthesis and antiviral activity of (E)- and (Z)-9-[[2,2-bis(hydroxymethyl)-3-fluorocyclopropylidene]methyl]-adenines and guanines. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 26(3): 231-243.
- Zhou S, Drach JC, Prichard MN, Zemlicka J (2009) (Z)- and (E)-2-(1,2-dihydroxyethyl)methylenecyclopropane analogues of 2'-deoxyadenosine and 2'-deoxyguanosine. Synthesis of all stereoisomers, absolute configuration, and antiviral activity. *J Med Chem* 52(10): 3397-3407.
- Zhou S, Kern ER, Gullen E, Cheng YC, Drach JC et al. (2004) (Z)- and (E)-[2-Fluoro-2-(hydroxymethyl)cyclopropylidene]methylpurines and -pyrimidines, a new class of methylenecyclopropane analogues of nucleosides: synthesis and antiviral activity. *J Med Chem* 47(27): 6964-6972.
- Zou R, Kawashima E, Freeman GA, Koszalka GW, Drach JC et al. (2000) Design, synthesis, and antiviral evaluation of 2-deoxy-D-ribosides of substituted benzimidazoles as potential agents for human cytomegalovirus infections. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 19(1-2): 125-153.

Résumé

L'herpès virus de type 5 ou cytomegalovirus humain (CMVH) est la 1^{ère} cause d'infection congénitale malformative. Dans le monde, 1 % des nouveau-nés sont infectés par ce virus. L'infection congénitale à CMVH est un problème de santé publique majeur en raison des séquelles sévères chez le fœtus et le nouveau-né (microcéphalie, hépatomégalie, avortement spontané) et de l'absence de traitements. A ce jour, les mécanismes de transmission transplacentaire du virus de la mère au fœtus restent encore à élucider. Il existe plusieurs molécules (ganciclovir, cidofovir, foscarnet, valaciclovir), actuellement utilisées pour traiter les maladies à CMV (rétinite, pneumonie...). Ce sont toutes des inhibiteurs de la polymérase virale pUL54, protéine indispensable à la réplication du virus dans la cellule hôte. Ces traitements deviennent souvent inefficaces suite à l'émergence de mutations de résistance et sont responsables de toxicités cellulaires, les rendant inutilisables chez la femme enceinte.

Notre travail a consisté à développer deux modèles d'infection placentaire qui miment l'infection placentaire *in situ* : un modèle *ex vivo* et un modèle *in vivo* chez la souris. Ces modèles ont permis d'une part de suggérer une voie de propagation du virus dans les villosités flottantes du placenta, et d'autre part, de tester l'efficacité de sept nouvelles molécules anti-CMVH. Dans le but de réduire, voire d'éradiquer le virus dans les cellules et de diminuer la probabilité d'émergence de mutations de résistance, nous avons opté pour des combinaisons thérapeutiques de ces nouvelles molécules qui ciblent des stades différents de la réplication virale du CMVH. Six des sept molécules sélectionnées ont montré une forte capacité d'inhibition de l'infection CMVH *in vitro* et *ex vivo*. Les combinaisons thérapeutiques améliorent l'efficacité de chaque molécule administrée seule, et peuvent parfois conduire à une inhibition de l'infection de plus de 90 %.

Nos résultats sont très encourageants et indiquent que la bithérapie serait une approche thérapeutique particulièrement intéressante à développer et étudier pour éradiquer le CMVH dans la cellule hôte.

Mots clefs : Cytomegalovirus, infection placentaire, modèle *ex vivo*, modèle *in vivo*, artésunate, flavonoïdes, maribavir, anti-Cdks

Abstract

Herpes virus type 5 or human cytomegalovirus (HCMV) is the first cause of congenital malformation infection. In the world, 1% of newborns are infected with this virus. Congenital HCMV infection is a major public health problem due to severe sequelae in the fetus and newborn (microcephaly, hepatomegaly, spontaneous abortion) and the absence of treatments. So far, mechanisms of transplacental transmission from mother to fetus remain to be elucidated. There are several molecules (ganciclovir, cidofovir, foscarnet, valaciclovir), currently used to treat CMV disease (retinitis, pneumonia ..). These are all inhibitors of the viral polymerase pUL54, essential protein for virus replication in the host cell. These treatments often become ineffective due to the emergence of resistance mutations and are responsible for cellular toxicity, rendering them unsuitable for pregnant women.

Our work consisted in develop two placental infection models that mimic *in situ* placental infection: an *ex vivo* model and an *in vivo* mouse model. These models on one hand mimic a way of spreading the virus in the floating villi of the placenta, and secondly, allowed to test the effectiveness of seven new anti-HCMV molecules. In order to reduce or eradicate the virus in cells and decrease the likelihood of emergence of resistance mutations, we opted for therapeutic combinations of these new molecules that target different stages of the viral replication of HCMV. Six of the seven selected molecules showed strong inhibition of HCMV infection *in vitro* and *ex vivo* capacity. Combination therapy improves the efficiency of each molecule administered alone, and can sometimes lead to an inhibition of infection of over 90%.

Our results are very encouraging and show that the combination would be particularly interesting to study and develop therapeutic approach to eradicate HCMV in the host cell.

Keywords: Cytomegalovirus, placental infection, *ex vivo* model, *in vivo* model, artesunate, flavonoïds, maribavir, anti-Cdks